

Junio de 2021

Manual de uso de Investigator[®] Argus Y-28 QS

Para la amplificación múltiple de 27 loci STR del
cromosoma Y con Sensor de Calidad

Contenido

Contenido del kit	3
Envío y almacenamiento	4
Uso previsto	4
Información de seguridad	5
Control de calidad	5
Introducción	6
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	9
Protocolo: amplificación por PCR	11
Protocolo: Electroforesis utilizando el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer	14
Protocolo: análisis	27
Software de análisis	27
Controles	28
Características especiales	29
Sensor de calidad	31
Guía de resolución de problemas	36
Referencias	40
Apéndice A: Interpretación de los resultados	41
Apéndice B: Variación de los volúmenes de PCR con Investigator Argus Y-28 QS Kit	43
Apéndice C: Amplificación directa de ADN con el Investigator Argus Y-28 QS Kit	44
Apéndice D: Amplificación Rápida de ADN a partir de Muestras de Referencia con el Investigator Argus Y-28 QS Kit	53
Información para pedidos	56
Historial de revisiones del documento	58

Contenido del kit

Investigator Argus Y-28 QS Kit	(100)	(400)
N.º de catálogo	383625	383627
Número de reacciones de 25 µL	100	400
Fast Reaction Mix 3.0*	750 µL	4 x 750 µL
Nuclease-free water	1,9 mL	4 x 1,9 mL
Primer Mix Argus Y-28 QS	250 µL	4 x 250 µL
Control DNA 9948 (0,1 ng/µL)	40 µL	40 µL
Allelic ladder Argus Y-28 QS	25 µL	3 x 25 µL
DNA Size Standard 24plex (BTO)	55 µL	220 µL

* Contiene ADN polimerasa, dNTP, MgCl₂ y albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin, BSA).

Envío y almacenamiento

El Investigator Argus Y-28 QS Kit se suministra en hielo seco. Se debe almacenar inmediatamente tras la recepción a una temperatura de congelación constante de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Evite la descongelación y la congelación repetidas. La mezcla de cebador y la escalera alélica se deben almacenar protegidas de la luz. Las muestras de ADN y los reactivos posteriores a la PCR (Allelic ladder Argus Y-28 QS y DNA Size Standard 24plex [BTO]) se deben almacenar separados de los reactivos de PCR. Bajo estas condiciones, los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Una vez abierto, el Investigator Argus Y-28 QS Kit debe almacenarse a una temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 6 meses.

Uso previsto

El Investigator Argus Y-28 QS Kit está previsto para aplicaciones de biología molecular en análisis forenses, de identidad humana y en pruebas de paternidad. Este producto no está destinado para el diagnóstico, la prevención ni el tratamiento de enfermedades.

Durante la manipulación de los productos, deben extremarse el cuidado y la atención. Recomendamos a todos los usuarios de los productos de QIAGEN® que sigan las directrices NIH desarrolladas para experimentos de ADN recombinante o bien otras directrices aplicables.

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

Control de calidad

En cumplimiento con el sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de Investigator Argus Y-28 QS Kit se analiza a partir de las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos. Los Investigator Argus Y-28 QS Kits cumplen los requisitos de la norma ISO 18385.

Introducción

El Investigator Argus Y-28 QS Kit es una aplicación múltiple para loci de repeticiones cortas en tándem (Short Tandem Repeat, STR) del cromosoma Y. La PCR amplifica simultáneamente los 27 marcadores Y-STR que se enumeran más adelante.

La mezcla de cebador del Investigator Argus Y-28 QS Kit contiene dos innovadores controles de PCR internos (sensores de calidad QS1 y QS2) que ofrecen información útil sobre la eficiencia de la PCR y la presencia de inhibidores de la PCR. Los sensores de calidad se amplifican de manera simultánea con los marcadores STR polimórficos.

El Investigator Argus Y-28 QS Kit se ha desarrollado específicamente para la generación rápida y fiable de perfiles de ADN masculino a partir de mezclas de ADN masculino y femenino, de forma que no es necesaria la separación de los espermatozoides de células femeninas o la lisis diferencial. Con la inclusión de 6 marcadores de mutación rápida (DYS449, **DYS481**, **DYS570**, **DYS576**, **DYS518** y **DYS627**), el kit también ayuda a la resolución de linajes paternos y la discriminación distinción entre varones estrechamente relacionados.

El kit utiliza la tecnología de PCR de ciclado rápido de QIAGEN. Esto proporciona resultados altamente fiables gracias a sus químicas resistente a inhibidores. Los cebadores están marcados mediante fluorescencia con estos colorantes:

- 6-FAM™: **DYS389-I**, **DYS391**, **DYS389-II**, **DYS533**, **DYS390**, **DYS643**
- BTG: **DYS458**, **DYS393**, **DYS19**, **DYS437**, **DYS449**
- BTY: **DYS460**, **DYS576**, **YGATAH4**, **DYS481**, **DYS448**, **DYS518**
- BTR2: **DYS439**, **DYS549**, **DYS438**, **DYS456**
- BTP: **QS1**, **DYS570**, **DYS635**, **DYS385**, **DYS392**, **DYS627**, **QS2**

La cantidad óptima de ADN en condiciones normales es de 0,5 ng. Validaciones internas han demostrado la obtención de resultados fiables con menos de 0,1 ng de ADN.

El Investigator Argus Y-28 QS Kit se validó empleando los termocicladores QIAamplifier®, Applied Biosystems® Veriti® y los Applied Biosystems 3500 y 3500XL Genetic Analyzers.

Para obtener información sobre microvariantes conocidas no incluidas en la escalera alélica de Investigator Argus Y-28 QS Kit, consulte la página web del National Institute of Standards and Technology (NIST) (strbase.nist.gov/) y la base de datos de referencia del haplotipo del cromosoma Y en www.yhrd.org.

Tabla 1. Información específica de los loci del Investigator Argus Y-28 QS Kit

Locus	Número de acceso GenBank®	Motivo de repetición del alelo de referencia
DYS19	AC017019	TAGA
DYS385*	AC022486	GAAA
DYS389-I	AC004617	[TCTG][TCTA]
DYS389-II	AC004617	[TCTG][TCTA]
DYS390	AC011289	[TCTG][TCTA]
DYS391	AC011302	TCTA
DYS392	AC011745	TAT
DYS393	AC006152	AGAT
DYS437	AC002992	TCTA
DYS438	AC002531	TTTTC
DYS439	AC002992	GATA
DYS448	AC025227	AGAGAT
DYS449	AC051663	TTTC
DYS456	AC010106	AGAT
DYS458	AC010902	GAAA
DYS460	AC009235	ATAG
DYS481	NC000024	CTT
DYS518	NC000024	AAAG
DYS533	AC053516	ATCT
DYS549	AC010133	GATA
DYS570	AC012068	TTTC
DYS576	AC010104	AAAG
DYS627	NC000024	AAAG
DYS635	AC004772	Compuesto TSTA
DYS643	AC007007	CITTT
YGATAH4	AC011751	TAGA

* locus duplicado

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Todos los protocolos

- Hi-Di™ Formamide, 25 mL (Applied Biosystems, n.º de cat. 4311320)
- Matrix Standard BT6 (n.º de cat. 386224) para instrumentos multicapilares como los 3500 Genetic Analyzers
- Uno de los siguientes analizadores de ADN:
 - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- Uno de los siguientes termocicladores de PCR: *
 - QIAGEN QIAamplifier
 - Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler
 - GeneAmp® PCR System 9700
 - Bio-Rad® PTC-200
 - Biometra® UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Tubos o placas de PCR
- Pipetas y puntas de pipeta
- Microcentrífuga para tubos o placas de PCR

* Esta no es una lista completa de proveedores y no incluye a numerosos proveedores importantes de suministros biológicos.

Software de análisis validado para productos de identificación humana

Los Investigator Human Identification PCR Kits requieren una calibración con una escalera alélica. Por consiguiente, el software utilizado debe ser compatible con los productos de identificación humana para aplicaciones forenses. Recomendamos el GeneMapper® ID-X Software. Los archivos de plantilla Investigator facilitan el análisis de los datos y son compatibles con este software.

Protocolo: amplificación por PCR

Este protocolo sirve para la amplificación por PCR de los loci STR de muestras forenses mediante el Investigator Argus Y-28 QS Kit.

Consideraciones importantes antes de comenzar

- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona distinta a la utilizada para el aislamiento de ADN y el análisis del producto de PCR (análisis post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada.
- La cantidad recomendada de ADN en condiciones normales es de 0,5 ng. Validaciones internas mostraron resultados robustos y balanceados con cantidades entre 0,2 y 2 ng de ADN y resultados fiables con cantidades inferiores a 0,1 ng de ADN.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos que contienen los componentes de la PCR, agítelos en vórtex y centrifúgelos brevemente para colectar el contenido en el fondo de los tubos.

Procedimiento

1. Descongele los componentes PCR y el ácido nucleico molde.

Mezcle bien. Centrifugue brevemente antes de su uso.

2. Prepare la mezcla maestra según la Tabla 2.

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, excepto el ADN molde (muestra) y agua libre de nucleasas.

Dado que puede producirse cierto grado de pérdida de reactivos durante las transferencias, prepare la mezcla incluyendo las reacciones adicionales. Incluya también reacciones para los controles positivo y negativo.

3. Agite completamente la mezcla maestra en vórtex, centrifugue brevemente y dispense los volúmenes adecuados en tubos de PCR o en los pocillos de una placa de PCR.
4. Añada el ADN molde y agua libre de nucleasas a la mezcla maestra hasta obtener un volumen de muestra final de 25 μL .
5. Prepare controles positivos y negativos.

Control positivo: Utilice 5 μL de ADN de control (es decir, 0,5 ng).

Control negativo: para la reacción, utilice agua libre de nucleasas en lugar de ADN molde.

Tabla 2. Preparación de las reacciones

Componente	Volumen por reacción
Fast reaction mix 3.0	7,5 μL
Primer mix	2,5 μL
Nuclease-free water (añadida en el paso 4)	Variable
ADN molde (añadido en el paso 4)	Variable
Volumen total	25 μL

6. Si se ha pipeteado ADN molde en el borde o la tapa del tubo de PCR, centrifugue brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
7. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante utilizando las condiciones descritas en la Tabla 3.
8. Cuando haya finalizado el protocolo de ciclado, almacene las muestras a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz o continúe directamente con la electroforesis.

Tabla 3. Protocolo de ciclado estándar recomendado para todas las muestras de ADN

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 $^{\circ}\text{C}$ *	12 min	–
96 $^{\circ}\text{C}$	10 s	
61,5 $^{\circ}\text{C}$	1 min 25 s	30 ciclos
72 $^{\circ}\text{C}$	5 s	
68 $^{\circ}\text{C}$	5 min	–
60 $^{\circ}\text{C}$	5 min	–
10 $^{\circ}\text{C}$	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Tabla 4. Protocolo de ciclado opcional, recomendado para manchas que contienen pequeñas cantidades de ADN (<100 pg)

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 °C*	12 min	–
96 °C	10 s	
61,5 °C	1 min 25 s	31 ciclos
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	–
60 °C	5 min	–
10 °C	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Protocolo: Electroforesis utilizando el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

El Investigator Argus Y-28 QS Kit está destinado para su uso con el 3500/3500xL Genetic Analyzer, el cual requiere el siguiente software:

- 3500 Data Collection Software

Nota: El usuario debe de haber iniciado sesión en el ordenador como administrador local o con derechos equivalentes de acceso para permitir la escritura de datos en los archivos correspondientes.

Para obtener instrucciones detalladas sobre la configuración del instrumento, la calibración espectral o la aplicación de los softwares Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software y el GeneMapper ID-X Software, consulte la *Guía de usuario de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide) (tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf).

El sistema con 8 capilares es el Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. El sistema con 24 capilares es el Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

El juego de filtros virtuales AnyDye se utiliza para la aplicación combinada de los 6 fluoróforos 6 FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP y BTO. Esta matriz estándar se conoce como BT6.

Los materiales necesarios para la electroforesis se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Materiales necesarios para la electroforesis

Material	Especificaciones
Capilar	Matriz de 36 cm para el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polímero	POP-4® para el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Tampón	Anode buffer container (ABC) 3500 series Cathode buffer container (CBC) 3500 series

Calibración espectral/generación de la matriz

Antes de realizar un análisis de tamaño de fragmentos de ADN, debe realizar una calibración espectral con los 6 fluoróforos 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP y BTO para cada analizador (Tabla 6). El procedimiento de calibración crea una matriz que se utiliza para corregir la superposición de los espectros de emisión de fluorescencia de los colorantes.

Importante: la calibración espectral debe realizarse para cada nuevo arreglo de capilares. Comprende los siguientes pasos:

- Preparación del instrumento
- Preparación de la placa de calibración estándar
- Preparación y carga de la placa en el instrumento
- Configuración del juego de colorantes BT6 en el software
- Realización de una corrida de calibración espectral
- Comprobación de la matriz

Preparación del instrumento

Antes de la calibración espectral, asegúrese de que se haya realizado una calibración espacial. Este proceso se describe en detalle en la *Guía de usuario de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Tabla 6. Los 6 fluoróforos de BT6

Color	Matriz estándar
Azul (B)	6-FAM
Verde (G)	BTG
Amarillo (Y)	BTY
R rojo (R)	BTR2
Morado (P)	BTP
Naranja (O)	BTO

Preparación de la placa de calibración estándar para 8 capilares (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Antes de abrir los tubos, agítelos en vórtex y centrifúgelos brevemente para coleccionar el contenido en el fondo de los tubos.
2. Prepare una mezcla de formamida y de Matrix Standard BT6 según la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de formamida y de Matrix Standard BT6 para 8 capilares

Componente	Volumen
Hi-Di Formamide	90 µL
Matrix Standard BT6 multi cap.	10 µL

3. Agite en vórtex y luego centrifugue la mezcla brevemente.
4. Cargue 10 µL de la mezcla en cada uno de los 8 pocillos en una placa de 96 pocillos en las posiciones A1–H1.
5. Desnaturalice durante 3 minutos a 95 °C.
6. Efectúe una congelación inmediata colocando la placa sobre hielo durante 3 minutos.
Como alternativa, se puede utilizar un termociclador a 4 °C para enfriar la placa.

Preparación de la placa de calibración estándar para 24 capilares (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

7. Antes de abrir los tubos, agítelos en vórtex y centrifúgelos brevemente para coleccionar el contenido en el fondo de los tubos.
8. Prepare una mezcla de formamida y de Matrix Standard BT6 según la Tabla 8.

Tabla 8. Preparación de la mezcla de formamida y de Matrix Standard BT6 para 24 capilares

Componente	Volumen
Hi-Di Formamide	225 µL
Matrix Standard BT6 multi cap.	25 µL

9. Agite en vórtex y luego centrifugue la mezcla brevemente.
10. Cargue 10 µL de la mezcla en cada uno de los 24 pocillos en una placa de 96 pocillos en las posiciones A1–H1, A2–H2 y A3–H3.

11. Desnaturalice durante 3 minutos a 95 °C.

12. Efectúe una congelación inmediata colocando la placa sobre hielo durante 3 minutos.

Como alternativa, se puede utilizar un termociclador a 4 °C para enfriar la placa.

Preparación y carga de la placa en el instrumento

Los pasos necesarios se describen en detalle en la *Guía de usuario de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Configuración del software para el conjunto de colorantes BT6

Antes de la calibración espectral, debe configurarse un conjunto de colorantes para el Matrix Standard BT6.

1. Para crear un nuevo conjunto de colorantes, seleccione "Library". Debajo de "Analyze", vaya a "Dye Sets" y haga clic en "Create".
2. Introduzca el nombre del conjunto de colorantes en "Dye Set Name", por ejemplo, "BT6".
3. En "Chemistry" seleccione "Matrix Standard" y en "Dye Set Template" seleccione "AnyDye Template".
4. En "Calibration Peak Order", ordene los colores de la siguiente forma: 6 (azul), 5 (naranja), 4 (verde), 3 (amarillo), 2 (rojo) y 1 (morado).

Nota: Esta es la configuración de orden de picos correcta en el instrumento, aunque el orden de picos de la Matrix Standard BT6 es diferente.

5. Modifique los ajustes de la sección "Parameters" tal como se indica a continuación:

Matrix Condition Number Upper Limit: 13,5

Locate Start Point After Scan: 1000

Locate Start Point Before Scan: 5000

Limit Scans To: 2750

Sensitivity: 0,4

Minimum Quality Score: 0,95

6. Haga clic en "Save" para confirmar los cambios.

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: BT6

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: AnyDye Template

Arrange Dyes

Dye Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reduced Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calibration Peak Order	6	4	3	2	1	5

Parameters

The parameters will be used for instruments configured with 36cm capillary array and polymer POP4

Matrix Condition Number Upper Limit: 13.5

Locate Start Point: * After Scan: 1000, * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 2750

Sensitivity: 0.4

* Minimum Quality Score: 0.95

Notes

Close Save

Figura 1. Configuración del conjunto de colorantes BT6.

Realización de una corrida de calibración espectral

Cuando las placas multipocillo que contienen la mezcla de calibración espectral se hayan colocado en la bandeja de automuestreo, puede iniciarse el proceso de calibración espectral.

1. Para acceder a la pantalla Spectral Calibration (Calibración espectral), seleccione "Maintenance" en el Dashboard del programa 3500 Series Data Collection Software.
2. Para configurar un ciclo de calibración, vaya a "Calibrate", "Spectral" y a continuación seleccione "Calibration Run".
3. Se debe especificar el número de pocillos en la placa de calibración espectral y la posición en el instrumento.
4. Seleccione "Matrix Standard" en "Chemistry Standard" y en "Dye Set" seleccione el estándar BT6 previamente creado (consulte "Configuración del software para el conjunto de colorantes BT6").
5. **Opcional:** Habilite la opción "Allow Borrowing".
6. Haga clic en "Start Run".

Comprobación de la matriz

Haga clic en un capilar de la tabla para visualizar los resultados de cada capilar debajo de la tabla de resultados de la corrida ("Capillary", "Quality value" y "Condition Number").

- El valor de calidad (Q value) de cada capilar debe ser superior a 0,95 y el rango del número de condición (C value) debe estar 1 y 13,5.
- Verifique las muestras de matriz para una línea de base plana. Como se muestra en la Figura 2, deben existir 6 picos con alturas de aproximadamente entre 1000 y 6000 UFR para cada muestra de matriz.

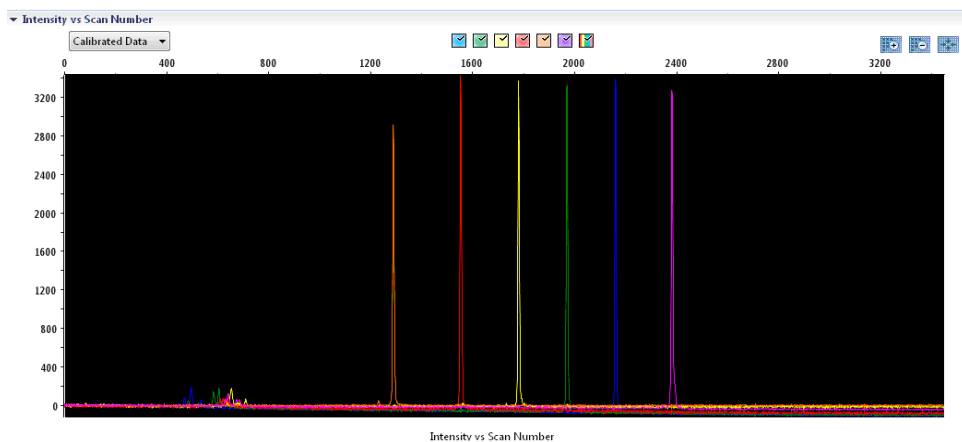


Figura 2. Electroferograma de calibración espectral del Matrix Standard BT6 en un Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Si se ha completado una calibración espectral con éxito, la fila “Overall” muestra resultados en verde (Figura 3). Si la fila “Overall” muestra resultados en rojo, consulte la sección “Spectral calibration troubleshooting” de la *Guía de usuario de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

▼ Capillary Run Data

Capillary	1	2	3	4	5	6	7	8
Run 1	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 2	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 3	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Overall	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 Not Calibrated

Figura 3. Ejemplo de calibración espectral correcta del Matrix Standard BT6 para todos los capilares en un Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Para cada capilar, seleccione y visualice los datos espectrales crudos. Compruebe si los datos cumplen los criterios siguientes:

- El orden de los picos en el perfil espectral de izquierda a derecha debe indicar naranja-rojo-amarillo-verde-azul-morado.

- No deben aparecer picos extraños en el perfil de datos crudos.
- La morfología de los picos en el perfil espectral no debe mostrar superposiciones, caídas ni otras irregularidades. Se deben visualizar picos separados y bien diferenciados.

Si los datos para todos los capilares cumplen los criterios anteriores, haga clic en “Accept”. Si un dato de algún capilar no cumple los criterios anteriores, haga clic en “Reject” y consulte la sección “Spectral calibration troubleshooting” de la *Guía de usuario de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Preparación de las muestras

1. Antes de abrir los tubos, agítelos en vórtex y centrifúgelos brevemente para coleccionar el contenido en el fondo de los tubos
2. Prepare una mezcla de formamida y del estándar de tamaño de ADN según la Tabla 9.
3. Agite en vórtex y luego centrifugue brevemente la mezcla.
4. Para cada muestra que desee analizar, introduzca 12 µL de la mezcla en un tubo.
5. Añada 1 µL de producto de PCR o de escalera alélica (diluido si es necesario).
6. Desnaturalice durante 3 minutos a 95 °C.
7. Efectúe una congelación inmediata colocando la placa sobre hielo durante 3 minutos.
8. Como alternativa, se puede utilizar un termociclador a 4 °C para enfriar la placa.
9. Cargue las muestras en la bandeja.

Tabla 9. Preparación de la mezcla de formamida y de estándar de tamaño de ADN

Componente	Volumen por muestra
Hi-Di Formamide	12,0 µL
DNA Size Standard (BTO)	0,5 µL

Nota: Debido a que las inyecciones se realizan simultáneamente en todos los capilares, se debe pipetear como mínimo 1 columna entera (protocolo de 8 muestras) o 3 columnas enteras (protocolo de 24 muestras) en las placas de analizadores multicapilares. Si se analiza un número menor de muestras, las posiciones vacías se deben llenar con 12 µL de Hi-Di Formamide.

Para asegurar una asignación alélica fiable en los analizadores multicapilares, inyecte una escalera alélica para cada conjunto de 24 muestras:

- Instrumentos de 8 capilares: Una escalera alélica por cada 3 inyecciones
- Instrumentos de 24 capilares: Una escalera alélica por inyección

Importante: La temperatura ambiente puede influir en el rendimiento de los productos PCR en los instrumentos multicapilares, de modo que pueden producirse subpicos o picos dobles, especialmente a temperaturas más bajas. Asegúrese de mantener las condiciones ambientales recomendadas por el fabricante del instrumento. Además, asegúrese de que las soluciones amortiguadoras se equilibren a las condiciones ambientales.

Configuración de una corrida

Si utiliza por primera vez el Investigator Argus Y-28 QS Kit en un Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, deberá configurar primero una serie de protocolos:

- Instrument Protocol
- Size Standard
- QC Protocol
- Assay

Todos los protocolos se pueden configurar mediante el Dashboard (Pantalla principal) del 3500 Series Data Collection Software.

Protocolo del instrumento

1. Para configurar el Protocolo del instrumento, seleccione "Library" y en "Analyze" vaya a "Instrument Protocols" y haga clic en "Create".

Nota: Modifique los ajustes predeterminados del "Run Module" de "HID36_POP4" como se muestra en la Tabla 10.

2. Los parámetros de la Tabla 10 se deben introducir o seleccionar.
3. Haga clic en "Save" para confirmar los cambios.

Tabla 10. Parámetros de protocolo del instrumento para el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Parámetro	Ajuste para 3500	Ajuste para 3500xL
Application type	HID	HID
Capillary length	36 cm	36 cm
Polymer	POP4	POP4
Dye set	P. ej. BT6	P. ej. BT6
Run module	HID36_POP4	HID36_POP4
Protocol name	P. ej., Investigator Argus Y-28	P. ej., Investigator Argus Y-28
Oven temperature (°C)	Predeterminado (60)	Predeterminado (60)
Run Voltage (kV)	13,0	13,0
PreRun voltage (kV)	Predeterminado (15)	Predeterminado (15)
Injection voltage (kV)	1,2	1,6
Run time (s)	1550	1550
PreRun time (s)	Predeterminado (180)	Predeterminado (180)
Injection time (s)	30,0*	27,0*
Data delay (s)	Predeterminado (1)	Predeterminado (1)
Advanced options	Predeterminado	Predeterminado

* Modificaciones respecto a los ajustes anteriores; el tiempo de inyección se puede variar en función del tipo de muestras y del número de ciclo de PCR utilizados. El "injection time" define el tiempo de inyección máximo a un voltaje determinado. Si se registran muestras con intensidades de señal muy elevadas, se puede seleccionar un tiempo de inyección más corto para reducir el riesgo de picos pull-up.

Estándar de tamaño

1. Para configurar el Estándar de tamaño, seleccione "Library" y en "Analyze" vaya a "Size Standards" y haga clic en "Create".
2. Los parámetros en la Tabla 11 se deben introducir o seleccionar.

El DNA Size Standard 24plex (BTO) se debe utilizar con los siguientes tamaños de fragmentos:

- DNA Size Standard 24plex (BTO): 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 y 550 bp

Tabla 11. Parámetros del estándar de tamaño

Parámetro	Ajuste
Size Standard	P. ej., SST-BTO_60-500bp
Dye color	Orange

3. Alternativamente se pueden importar los parámetros del estándar de tamaño de ADN utilizando los archivos de plantilla Investigator recomendados (Tabla 16).
4. Haga clic en "Save" para confirmar los cambios.

Protocolo de control de calidad

1. Para configurar el Protocolo de control de calidad, seleccione "Library" y en "Analyze" vaya a "QC Protocols" y haga clic en "Create".
2. Los parámetros en la Tabla 12 se deben introducir o seleccionar.

Tabla 12. Parámetros del protocolo de control de calidad

Parámetro	Ajuste
Protocol name	P. ej. BTO_550
Size Standard	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

3. Vaya a "Analysis Settings" y después a "Peak Amplitude Threshold" y asegúrese de que estén habilitados todos los colores.

Compruebe la configuración de análisis recomendada en la Tabla 13. Todos los demás ajustes deben permanecer como "Default".

4. Haga clic en "Save" para confirmar los cambios.

Ensayo

1. Para configurar un Ensayo, vaya a "Library" y en "Manage" vaya a "Assays", a continuación, haga clic en "Create".
2. Para analizar los fragmentos del Investigator Argus Y-28, seleccione los parámetros de la Tabla 13.

3. Haga clic en “Save” para confirmar los cambios.

Tabla 13. Parámetros del ensayo

Parámetro	Ajuste
Assay name	P. ej., Investigator Argus Y-28
Color	Default
Application type	HID
Instrument Protocol	P. ej., Investigator Argus Y-28
QC protocols	P. ej. BTO_550

Inicio de la corrida

1. En la pantalla principal Dashboard, haga clic en “Create New Plate”.
2. Vaya a “Setup” y después a “Define Plate Properties” y a continuación, seleccione “Plate Details”. Seleccione o introduzca los parámetros de la Tabla 14.

Tabla 14. Propiedades de la placa

Propiedades	Ajuste
Name	P. ej., Investigator Argus Y-28
Number of wells	96
Plate type	HID
Capillary length	36 cm
Polymer	POP4

3. Haga clic en “Assign Plate Contents” para aplicar los cambios.
4. Introduzca el nombre designado para las muestras en cada pocillo que contenga una muestra o una escalera alélica. De este modo se identificarán las posiciones de los pocillos de cada muestra para la colecta de datos y el procesamiento.
5. En “Assay”, seleccione el ensayo correcto para el análisis. Si ha seguido los pasos indicados en la “Configuración de una corrida”, haga clic en “Add from Library” y seleccione “Investigator Argus Y-28” como “Instrument Protocol”. Todos los pocillos de la placa que tengan un nombre deben tener asignado un ensayo.
6. Repita el procedimiento para “File name conventions” y “Results group”.

7. Seleccione los pocillos para los cuales se debe especificar un ensayo. Marque las casillas junto al nombre de "Assay", "File name conventions" y "Results group" para asignarlos a los pocillos seleccionados.
8. Si todavía no lo ha hecho, cargue la placa preparada en el instrumento y cierre la puerta del instrumento. Haga clic en "Link Plate for Run". En la pantalla siguiente, introduzca el nombre de corrida deseado y después haga clic en "Start Run".

Parámetros de análisis/método de análisis

La Tabla 15 indica los parámetros de análisis recomendados en la ventana Peak Detector.

Tabla 15. Ajustes recomendados para el Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Parámetro	Ajustes
Peak detection algorithm	Advanced
Ranges	Analysis: Partial Range Start Point: 1000; Stop Point: 20.000 Sizing: All Sizes
Smoothing and baselining	Smoothing: Light Baseline Window: 51 pts
Size calling method	Local Southern Method
Peak detection	Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* P:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 pts [†] Slope Thresholds: 0,0

* El valor de corte de "Peak Amplitude Thresholds" (umbral de amplitud de picos) corresponde a la altura de picos mínima que se detectará con el programa GeneMapper ID-X. Normalmente, los umbrales se sitúan entre 50 y 200 UFR y deben ser determinados individualmente por el laboratorio.

Recomendación: La altura de picos mínima debe ser 3 veces más alta que el ruido de fondo de la línea base.

[†] Únicamente el ajuste para el "Peak Window Size" es diferente de los ajustes predeterminados para el análisis HID de Applied Biosystems.

Protocolo: análisis

Para obtener instrucciones generales sobre el análisis de muestras automático, consulte la guía de usuario correspondiente del GeneMapper *ID-X* Software.

La localización de las longitudes exactas de los productos amplificados depende del tipo de dispositivo, de las condiciones de electroforesis y del estándar de tamaño de ADN utilizado. Debido a la complejidad de algunos loci, la determinación del tamaño debe basarse en referencias de distribución uniformes. El DNA Size Standard 24plex (BTO) se debe utilizar con los siguientes tamaños de fragmentos:

DNA Size Standard 24plex (BTO): 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 y 550 bp

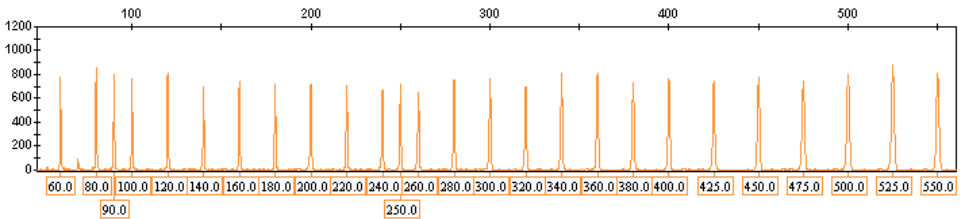


Figura 4. Electroferograma del DNA Size Standard 24plex (BTO). Fragmentos con longitudes en bp.

Software de análisis

La asignación alélica debe realizarse mediante un software de análisis adecuado (p. ej., el GeneMapper *ID-X* Software) en combinación con los archivos de plantilla Investigator, que están disponibles para descarga en www.qiagen.com.

Tabla 16. Archivos de plantilla Investigator recomendados para GeneMapper ID-X

Tipo de archivo	Nombre del archivo
Panels*	Argus Y-28_Panels
BinSets*	Argus Y-28_Bins
Stutter	Argus Y-28_Stutter
Size standard	SST-BTO_60–500bp
Analysis method	Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Plot settings	Plots_6dyes

* Los archivos Panels y BinSets se deben utilizar siempre, mientras que los demás archivos de plantillas son opcionales.

Controles

Los alelos enumerados en la Tabla 17 representan el Control DNA 9948 (incluido en el Investigator Argus Y-28 QS Kit).

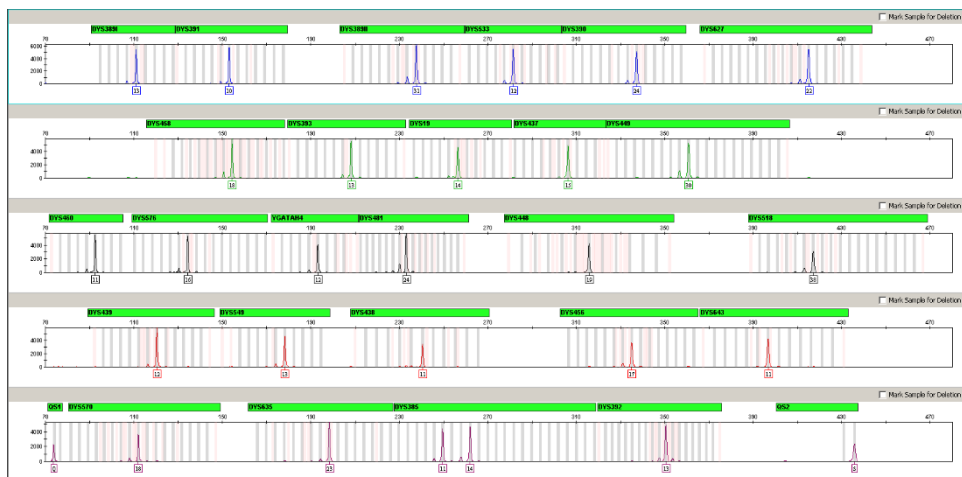


Figura 5. Electroferograma del control positivo DNA 9948 analizado en un Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

Características especiales

En general, el electroferograma muestra un único pico para cada locus Y-STR. Sin embargo, el locus DYS385 produce dos picos de distinto o del mismo tamaño. Estos dos fragmentos se originan a partir de copias duplicadas e inversas de un locus del cromosoma Y. Los cebadores suministrados con el Investigator Argus Y-28 QS Kit coamplifican simultáneamente los dos loci homólogos. Para la amplificación por separado, consulte la referencia 5. Si se obtiene más de un pico en el electroferograma para uno o varios marcadores, esto no sugiere necesariamente la mezcla de muestras. Las duplicaciones o triplicaciones de marcadores STR también dan lugar a dicho efecto y ya se han observado para DYS385 y DYS19 (7). En muy pocas ocasiones, los sistemas individuales también pueden fallar debido a deleciones del cromosoma Y según se conocen en pacientes azoospermicos, lo cual ya se ha descrito para DYS385 y DYS392 (8).

Tabla 17. Asignación de alelos de Investigator Argus Y-28 QS Kit

Locus	DNA 9948
DYS19	14
DYS385	11/14
DYS389-I	13
DYS389-II	31
DYS390	24
DYS391	10
DYS392	13
DYS393	13
DYS437	15
DYS438	11
DYS439	12
DYS448	19
DYS456	17
DYS458	18
DYS449	30
DYS460	11
DYS481	24
DYS518	38
DYS533	12
DYS549	13
DYS570	18
DYS576	16
DYS627	22
DYS635	23
DYS643	11
YGATAH4	12

Sensor de calidad

El Investigator Argus Y-28 QS Kit contiene dos controles internos de PCR (sensores de calidad QS1 y QS2) que proporcionan información general y útil sobre la eficiencia de la amplificación por PCR y sobre la presencia de inhibidores de la PCR. Los sensores internos de calidad se incluyen en la mezcla de cebadores y se amplifican de forma simultánea con los marcadores STR polimorfos. Los sensores de calidad están marcados con BTP y aparecen como fragmentos de tamaños de 74 pb (QS1) y 435 pb (QS2).

Para abordar el problema de la similitud de secuencias y la posibilidad de unión no específica, se diseñó un molde de ADN de control interno sintético con un algoritmo aleatorio. La secuencia del molde difiere de todas las secuencias de ADN conocidas; en concreto, no guarda similitud alguna con el ADN humano. Por lo tanto, la posibilidad de una unión no específica en el contexto de una reacción de amplificación mediante PCR múltiple es muy baja.

En general, la correcta amplificación del sensor de calidad pequeño (QS1) indica que la PCR se ha configurado y realizado de forma correcta, independientemente de si había ADN o no en la muestra. Si en el análisis de los productos de amplificación no se detecta ningún sensor de calidad, significa que el pipeteo durante la configuración de la PCR o la propia PCR se han realizado de forma incorrecta. El usuario puede repetir el experimento para lograr mejores resultados.

En experimentos de sensibilidad se ha observado que los controles internos no afectan al rendimiento de la PCR. La amplificación de bajas cantidades de moldes de ADN mostró resultados similares para la mezcla de cebadores con o sin los sensores de calidad.

Asimismo, el análisis de 2 fragmentos de controles internos, QS1 y QS2, y de los productos de amplificación STR permite la identificación diferencial de la presencia de inhibidores o la presencia de ADN degradado en una reacción de amplificación.

En caso de degradación de la muestra, la amplificación de los fragmentos más pequeños de ADN resulta más eficaz que la amplificación de los fragmentos más grandes. No obstante, la degradación del ADN molde no impide la amplificación de los fragmentos de los controles internos. Por lo tanto, una proporción igual entre el QS1 y el QS2, junto con una proporción mayor de los productos de PCR pequeños, indica la presencia de degradación de la muestra.

Si la muestra contiene inhibidores como la hematina o el ácido húmico, la amplificación resulta menos eficiente y los fragmentos de ADN grandes se amplifican en menor medida que los de menor tamaño. Si el análisis de los productos de amplificación indica una amplificación ineficiente de las secuencias molde de los STR grandes y del fragmento del sensor de calidad grande (QS2), pero el sensor de calidad pequeño (QS1) se amplifica de forma correcta, es probable que la muestra se haya contaminado con inhibidores. Esto significa que una desviación de la proporción a favor del sensor de calidad pequeño (QS1) indica la presencia de inhibidores.

El análisis de la presencia de ambos sensores de calidad permite al usuario identificar de forma diferencial la presencia de inhibidores de la PCR o la aparición de degradación en las muestras forenses. Esto aporta información útil al usuario para interpretar los datos y planificar los siguientes pasos. En la Tabla 18 se resumen los posibles aspectos del perfil y su significado.

Tabla 18. Apariencias del perfil y sus significados

Picos de alelos	QS1	QS2	Interpretación
Presente	Presente	Presente	Perfil correcto
Ausente	Presente	Presente	Sin ADN
Ausente	Ausente	Ausente	PCR fallida
Perfil en pendiente	Presente	Caída/ausente	Presencia de inhibidores
Perfil en pendiente	Presente	Presente	ADN degradado

Nota: Las alturas de picos de QS1 y QS2 pueden variar ligeramente entre distintos experimentos. Es habitual una ligera dispersión de la altura de los picos que no depende de la influencia de inhibidores. Durante la validación, el analista debe evaluar el espectro habitual de variaciones con relación al tipo de muestra determinado del que disponga y debe definir un rango de altura de pico regular para ambos QS.

Una caída en la señal de QS2 por debajo del 20 % respecto a la señal de QS1 indica inhibición de la reacción de PCR.

Alelos

La Tabla 19 muestra los alelos de la escalera alélica. Todos los análisis se realizaron con el polímero POP-4 (Tabla 19 y Figura 6). El uso de distintos instrumentos de análisis, estándares de tamaño de ADN o polímeros puede dar lugar a diferentes longitudes de fragmentos. Además, se recomienda realizar una alineación visual con la escalera alélica.

Ajuste de escala

- Horizontal: 70-470 pb
- Vertical: según la intensidad de la señal

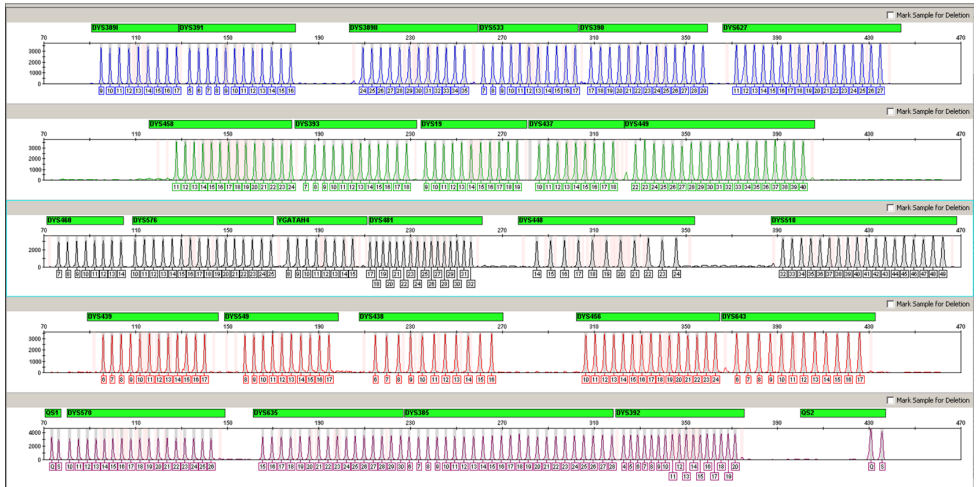


Figura 6. Electroferograma de la escalera alélica Argus Y-28 QS analizada en un Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer. La escalera alélica contiene 2 alelos para cada sensor de calidad (QS1 y QS2). Esto permite la identificación automatizada de los picos de QS para el análisis de la muestra.

Tabla 19. Fragmentos de escalera alélica.

Locus	Colorante	Números de repetición de la escalera alélica
DYS389-I	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS391	6-FAM	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
DYS389-II	6-FAM	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35
DYS533	6-FAM	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS390	6-FAM	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
DYS627	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
DYS458	BTG	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS393	BTG	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
DYS19	BTG	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
DYS437	BTG	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
DYS449	BTG	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
DYS460	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
DYS576	BTY	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
YGATAH4	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
DYS481	BTY	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
DYS448	BTY	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS518	BTY	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
DYS439	BTR2	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS549	BTR2	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
DYS438	BTR2	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
DYS456	BTR2	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
DYS643	BTR2	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
QS1	BTP	Q, S
DYS570	BTP	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
DYS635	BTP	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
DYS385	BTP	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
DYS392	BTP	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
QS2	BTP	Q, S

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Question, FAQ) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información o los protocolos de este manual de uso. Para consultar la información de contacto, acceda a support.qiagen.com.

Comentarios y sugerencias

Perfiles desbalanceados, señales bajas

- | | |
|---|--|
| a) Volumen incorrecto de "Fast Reaction Mix" o "Primer Mix" | Compruebe la preparación de la reacción y repita la amplificación. |
| b) La mezcla maestra no se mezcló en vórtex antes de ser dispensada | Agite bien la mezcla maestra en vórtex y centrifúguela brevemente. |

Artefactos en los perfiles

- | | |
|---|---|
| a) Cantidad excesiva de ADN femenino de fondo | Las mezclas masculinas/femeninas que contienen más de 1 µg de ADN humano total pueden dar lugar a la amplificación no específica a partir de cromosomas X y autosómicos (consulte la Figura 7 para ver un ejemplo). |
| b) Condiciones de hibridación erróneas | En caso de artefactos femeninos frecuentes por debajo de 1 µg de fondo, se deben comprobar las condiciones de hibridación. Asegúrese de que el protocolo utiliza una temperatura de hibridación de 61,5 °C para cualquier muestra con fondo femenino. Compruebe que el termociclador para PCR funciona correctamente. Utilice placas o tubos para PCR de pared fina para garantizar una transferencia de temperatura eficiente. De forma alternativa, aumente la temperatura de hibridación a 62-63 °C. |

Reducción de las alturas de picos de QS1 y/o QS2

Es normal que se produzca una ligera variación en la altura de los picos de los sensores de calidad, que no depende de la influencia de los inhibidores.

Durante la validación, el analista debe evaluar el espectro de variación habitual en relación con los tipos de muestras específicos y debe definir un intervalo regular de altura de los picos para ambos sensores de calidad. Una caída en la señal de QS2 por debajo del 20 % con respecto a la señal de QS1 indica inhibición de la reacción de PCR. Una reducción más pequeña de QS2 frente a QS1 indica una inhibición leve, si la proporción es claramente distinta a la observada en controles positivos y negativos de la misma serie.

Comentarios y sugerencias

Predominio de los picos de los sensores de calidad

Los picos de QS1 y QS2 son muy dominantes.

Si las muestras con altura de picos baja se analizan sin escala fija, los alelos del canal morado pueden mostrarse demasiado pequeños. En el programa GeneMapper *ID-X* Software, elija un nuevo ajuste para "all-dye range" en "Display Settings" para aumentar la visualización. El rango debe estar comprendido entre el sensor QS1 y el sensor QS2.

Importante: Adicionalmente, ajustar en "Analysis Method Editor", bajo "peak detector", el valor de size-calling (Ranges; Sizing) a 75 → 450.

Preparación de las muestras

Debe aumentarse la intensidad de la señal de la muestra.

Reduzca el volumen del DNA Size Standard (BTO) para alturas de pico de aproximadamente 500 UFR.

Purifique los productos de PCR antes de iniciar el análisis. Recomendamos el MinElute® PCR Purification Kit (números de catálogo 28004 y 28006) para conseguir una purificación rápida y efectiva.

La calibración espectral no es correcta

Existen picos pull-up entre los paneles de colorantes (B, G, Y, R, P, O) con la matriz/calibración espectral actual.

Los picos pull-up no deben superar el 5 % del pico causante, si el perfil permanece en el rango de detección lineal (p. ej., hasta 15,000 UFR en los 3500 Genetic Analyzers). Repita la calibración espectral.

En las muestras se etiquetan muchos picos como alelos fuera de la escalera (Off-Ladder, OL)

a) No se definió o identificó correctamente el DNA Size Standard 24plex (BTO).

Haga clic en el icono naranja del "Size Match Editor" en la barra de herramientas superior del GeneMapper *ID* o GeneMapper *ID-X* Software. Marque los fragmentos de color naranja de todas las muestras.

Utilice siempre el DNA Size Standard 24plex BTO incluido en los Investigator Human Identification PCR Kits.

b) Las intensidades de señal son demasiado altas. Si las alturas de los picos de las muestras se encuentran fuera del rango de detección lineal de Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers, la aparición de "stutters", picos abiertos y artefactos puede aumentar.

Reduzca el tiempo de inyección. Reduzca la cantidad de producto de amplificación de PCR para el análisis o reduzca la cantidad de ADN para la PCR.

c) Las burbujas en el capilar generan picos de pequeña intensidad en todos los paneles de color ("spikes"), que dan lugar a alelos mal etiquetados.

Repita la electroforesis para confirmar los resultados. Compruebe la cantidad máxima de inyecciones recomendada por el fabricante del instrumento. Prepare un nuevo arreglo de capilares, si es necesario.

Comentarios y sugerencias

- | | | |
|----|--|---|
| d) | Diferencias en el desempeño entre capilares de analizador multicapilar pueden dar lugar a una variación de la asignación alélica. | Para conseguir una asignación alélica fiable en analizadores multicapilares, cada tercera fila debe tener una escalera alélica. |
| e) | Una temperatura ambiente baja o una temperatura baja de la solución amortiguadora de la EC puede dar lugar a cambios en la migración de los fragmentos o a picos OL. | Asegúrese de mantener las condiciones ambientales recomendadas por el fabricante del instrumento. Asegúrese de que los amortiguadores se equilibren a las condiciones ambientales. Se recomienda precalentar el instrumento de EC (~30 min). El control de la temperatura es especialmente importante para los Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers. Los problemas de migración que se producen en la primera inyección del día o tras el cambio de amortiguadores indican una temperatura demasiado baja. |

Problemas de la escalera alélica

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Se puede identificar una señal adicional como pico de la escalera alélica debido a fallas de funcionamiento durante la electroforesis. Si se producen picos erróneos en la escalera alélica, esta no se podrá utilizar para el análisis. | Utilice una inyección o un archivo diferente de la escalera alélica y compruebe los datos de los tamaños analizados del estándar de tamaño (en pb) de la escalera alélica.
Utilice siempre el DNA Size Standard 24plex (BTO) para los Investigator Human Identification PCR Kits. |
| b) | Los picos de la escalera alélica se encuentran por debajo del valor de detección de picos (50-200 UFR) del método de análisis utilizado y, por consiguiente, no se identifican. | Compruebe la cantidad de escalera alélica utilizada. Compruebe que los parámetros de inyección son correctos.
De forma alternativa, se pueden analizar los datos de la escalera alélica con un valor de detección de picos menor en el software de análisis. |
| c) | No se identifica un pico de la escalera alélica porque se encuentra fuera del rango de tamaño (en pb) esperado del software | Compare la longitud de los fragmentos (en pb) del primer alelo que aparece en un color de la escalera alélica con el valor correspondiente en las categorías. Compárelo a continuación con los demás alelos. |
| d) | "Point alleles" no se han separado. | "Point alleles" son alelos con una diferencia de al menos 1 pb con respecto al siguiente alelo íntegro. Compruebe los ajustes del método de análisis y asegúrese de que el valor de "Peak Window Size" está establecido en 11 puntos. Compruebe el estándar de tamaño para detectar la aparición de picos anchos, lo que indica una resolución de tamaño insuficiente. Si la resolución es insuficiente, compruebe el uso del arreglo, el polímero y los amortiguadores y reemplácelos si es necesario. De forma alternativa, reduzca el tiempo de inyección. |

Comentarios y sugerencias

- e) Señales de escalera alélica demasiado altas.

Debido al elevado número de picos, las escaleras alélicas son más propensas a problemas de pequeña intensidad y de saturación de la señal. Los indicadores "Signal Off Scale" (SOS) en GMID/X indican que la intensidad de la señal global es demasiado alta. Las escaleras afectadas pueden mostrar perfiles desequilibrados, con picos más bajos en áreas de alelos superpuestos en varios colores. Reduzca la cantidad de escalera alélica o el tiempo de inyección.

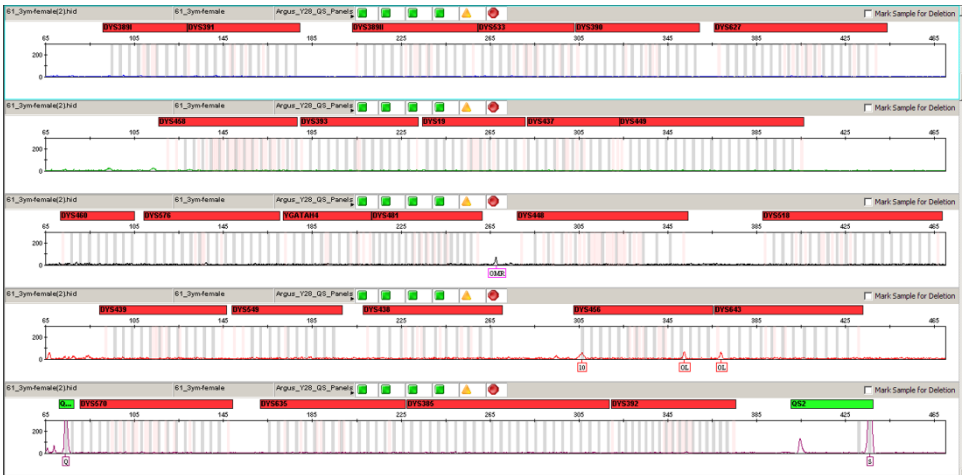


Figura 7. Ejemplo de artefactos de amplificación típicos provocados por exceso de ADN de fondo femenino. Se amplificaron 3 µg de ADN femenino a una temperatura de hibridación de 61 °C para inducir amplificación no específica. Los picos de artefactos más frecuentes se producen en el canal BTY entre los marcadores DYS481 y DYS448, y en el canal BTRI en las áreas de marcadores de DYS456 y DYS643.

Referencias

1. Gill, P., et al. (2001). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Int. J. Legal Med.* 114, 305.
2. Gill, P., et al. (2001). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci. Int.* 124, 5.
3. Gusmão, L., et al. (2005). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int. J. Legal Med.* 119, 1.
4. Kittler, R., Erler, A., Brauer, S., Stoneking, M., and Kayser, M. (2003). Apparent intrachromosomal exchange on the human Y chromosome explained by population history. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 304.
5. Füredi, S., Woller, J., Padar, Z., and Angyal, M. (1999). Y-STR haplotyping in two Hungarian populations. *Int. J. Legal Med.* 113, 38.
6. Butler, J.M., Decker, A.E., Kline, M.C., and Vallone, P.M. (2005). Chromosomal duplications along the Y-chromosome and their potential impact on Y-STR interpretation. *J. Forensic Sci.* 50, 1.
7. Stein, B., Willuweit, S., Nagy, M., Vogt, P.H., and Roewer, L. (2005). AZF deletions of the Y chromosome and failed amplification of commonly used Y-STRs. 21st Congress of the International Society for Forensic Genetics, Ponta Delgada, Portugal.
8. Szibor R, et al. (2003). Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138, 37.

Apéndice A: Interpretación de los resultados

El análisis posterior a la PCR y la asignación alélica automática con un software de análisis adecuado garantizan una diferenciación precisa y fiable de los alelos.

Procedimiento general de análisis

1. Compruebe el estándar de tamaño de ADN.
2. Compruebe la escalera alélica.
3. Compruebe los controles positivos y negativos.
4. Analice e interprete los datos de la muestra.

Picos de pequeña intensidad

Pueden surgir picos de pequeña intensidad si la altura de los picos se encuentra fuera del rango de detección lineal (consulte "Guía de resolución de problemas") o si se aplicó una matriz incorrecta. Aparecen en posiciones de picos específicos en otros canales de color, normalmente con intensidades de señal menores. Para evitar la aparición de picos de pequeña intensidad, la altura de los picos no debe superar los umbrales.

Picos Stutter

La aparición de picos stutter depende de la secuencia de la estructura de repeticiones y el número de alelos. Estos picos se deben interpretar mediante los archivos de plantilla Investigator para el programa GeneMapper *ID-X* Software.

Adición de nucleótidos independiente del ADN molde

Debido a su actividad de transferasa terminal, la *Taq* ADN polimerasa puede producir una adenilación incompleta en el extremo 3' de los fragmentos de ADN amplificados. El pico del artefacto es una base más corto de lo esperado (pico -1). Todos los cebadores incluidos en el Investigator Argus Y-28 QS Kit se han diseñado para reducir al mínimo estos artefactos. La altura del pico del artefacto guarda correlación con la cantidad de ADN. Se recomienda que los laboratorios definan sus propios límites para el análisis de los picos.

Artefactos

La temperatura ambiente puede influir en el rendimiento de los productos de PCR en los instrumentos multicapilares, por lo que pueden producirse subpicos o picos dobles. Si aparecen subpicos o picos dobles, recomendamos volver a inyectar la muestra. Asegúrese de mantener las condiciones ambientales recomendadas por el fabricante del instrumento. Asegúrese de que los amortiguadores se equilibren a las condiciones ambientales.

Apéndice B: Variación de los volúmenes de PCR con Investigator Argus Y-28 QS Kit

El Investigator Argus Y-28 QS Kit puede ejecutarse con la mitad del volumen de mezcla de reacción ("Fast Reaction Mix + Primer Mix"). Tenga en cuenta que si bien hemos probado exitosamente el volumen de reacción reducido aquí mencionado, por lo general aún se deben esperar tasas de éxito más altas a cuando se utiliza el volumen de reacción como se recomienda en el manual del kit.

Apéndice C: Amplificación directa de ADN con el Investigator Argus Y-28 QS Kit

Este protocolo describe cómo realizar el análisis de STRs mediante amplificación directa con el Investigator Argus Y-28 QS Kit.

Se ha determinado que las condiciones experimentales especificadas en este protocolo arrojan resultados óptimos. Sin embargo, en función del material de la muestra, pueden adaptarse los números de ciclos de PCR para garantizar las mejores tasas de éxito desde la primera ronda. Recomendamos procesar un lote representativo de muestras para confirmar que los números de ciclo asignados en este protocolo sean óptimos. Aumente el número de ciclo en 1 si las señales en los electroferogramas resultantes son demasiado bajas. Disminuya el número de ciclo en 1 si las señales en los electroferogramas resultantes son demasiado altas.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Para protocolos basados en células sanguíneas o bucales en papel

- UniCore Punch Kit 1.2 mm (n.º de cat. WB100028) y Cutting Mat, 6.0" x 8.0" (n.º de cat. WB100020)
- Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) o (200) (n.º de cat. 386528 o 386526)

Para protocolos basados en lisados de hisopados bucales

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (n.º de cat. 386516)
- Tubos de microcentrifuga de 2 mL
- Agitador para tubos de microcentrifuga de 2 mL

Protocolo: Amplificación por PCR a partir de sangre en FTA y otro papel

Este protocolo está indicado para la amplificación directa de loci STR mediante PCR con el Investigator Argus Y-28 QS Kit a partir de muestras de sangre en FTA y otro papel

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona distinta a la utilizada para el aislamiento de ADN y el análisis del producto de PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos que contienen los componentes de la PCR, agite en vórtex y centrifugue brevemente los tubos para coleccionar el contenido en el fondo.

Procedimiento

1. Prepare una mezcla maestra de acuerdo con la Tabla 20 (para reacciones de PCR de volumen completo) o de acuerdo con la Tabla 21 (para reacciones de PCR de volumen reducido).

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR. Prepare un volumen de mezcla de reacción un 10 % mayor que el requerido para el número total de ensayos de PCR que se van a realizar. Tal volumen debería incluir las reacciones de control positivo y negativo.

Tabla 20. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen completo

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	7,5 µL
Primer Mix	2,5 µL
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0 µL
Nuclease-free water	8,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	20,0 µL

Tabla 21. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen reducido

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	3,75 µL
Primer Mix	1,25 µL
Investigator STR GO! Punch Buffer*	2,0 µL
Nuclease-free water	3,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	10,0 µL

* Si se usan volúmenes de PCR reducidos, es importante utilizar siempre 2 µL del STR GO! Punch Buffer, independientemente del volumen de mezcla maestra. Todos los demás reactivos se deberían estar en escala proporcional. El laboratorio de análisis debe validar todos los cambios en el protocolo recomendado.

2. Agite en vórtex la mezcla de reacción meticulosamente y dispense el volumen de reacción total necesario por cada muestra en tubos de PCR o en los pocillos de una placa de PCR.
3. Realice una punción de 1,2 mm en el centro de la mancha de la muestra con una herramienta adecuada (p. ej., Uni Core Punch de 1,2 mm).
4. Transfiera un disco de 1,2 mm a cada reacción. No mezcle la reacción después de transferir el disco.
5. Prepare los controles positivos y negativos.

Control positivo: Utilice 2 µL de ADN de control (5 ng/µL).

Nota: Si las señales son demasiado bajas o demasiado altas en las PCRs posteriores, puede que necesite adaptar la cantidad de ADN control para su laboratorio tras ajustar el número de ciclo de PCR óptimo. No añada un disco en blanco al pocillo de control positivo.

Control negativo: No añada ADN molde al control negativo. No añada un disco en blanco o agua al tubo o pocillo de PCR del control negativo.

6. Centrifugue brevemente las reacciones para asegurarse de que los discos estén totalmente sumergidos.
7. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante aplicando las condiciones descritas en la Tabla 22.
8. Cuando haya finalizado el protocolo, almacene las muestras a una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz o continúe directamente con la electroforesis. Añada $1\text{ }\mu\text{L}$ del producto de PCR directamente a $12\text{ }\mu\text{L}$ de Hi-Di Formamide más el estándar de tamaño. Inicie la corrida en el analizador.

Tabla 22. Protocolo de ciclado recomendado para sangre en FTA y otro papel

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 °C*	12 min	–
96 °C	10 s	26 ciclos
60 °C	1 min 25 s	
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	–
60 °C	5 min	–
10 °C	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Protocolo: Amplificación por PCR a partir de células bucales en FTA y otro papel

Este protocolo está indicado para la amplificación directa de loci STR mediante PCR con el Investigator Argus Y-28 QS Kit a partir de muestras de células bucales en FTA y otro papel.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Para las células bucales recogidas con el Uni Core Punch de 1,2 mm, realice la punción en el área blanca. Este color indica la transferencia exitosa de la muestra.
- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona distinta a la utilizada para el aislamiento de ADN y el análisis del producto de PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos que contienen los componentes de la PCR, agite en vórtex y centrifugue brevemente los tubos para coleccionar el contenido en el fondo.

Procedimiento

1. Prepare una mezcla maestra de acuerdo con la Tabla 23 (para PCR de volumen completo) o de acuerdo con la Tabla 24 (para PCR de volumen reducido).

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR. Prepare un volumen de mezcla de reacción un 10 % mayor que el requerido para el número total de ensayos de PCR que se van a realizar. Tal volumen debería incluir las reacciones de control positivo y negativo.

Tabla 23. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen completo

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	7,5 µL
Primer Mix	2,5 µL
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0 µL*
Nuclease-free water	8,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	20,0 µL

* Si se usan volúmenes de PCR reducidos, es importante utilizar siempre 2 µL del STR GO! Punch Buffer, independientemente del volumen de mezcla maestra. Todos los demás reactivos se deberían escalar de forma proporcional. El laboratorio de análisis debe validar todos los cambios en el protocolo recomendado.

Tabla 24. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen reducido

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	3,75 µL
Primer Mix	1,25 µL
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0 µL*
Nuclease-free water	5,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	12 µL

* Si se usan volúmenes de PCR reducidos, es importante utilizar siempre 2 µL del STR GO! Punch Buffer, independientemente del volumen de mezcla maestra. Todos los demás reactivos se deberían escalar de forma proporcional. El laboratorio de análisis debe validar todos los cambios en el protocolo recomendado.

2. Agite en vórtex la mezcla de reacción meticulosamente y dispense el volumen de reacción total necesario por cada muestra en tubos de PCR o en los pocillos de una placa de PCR.
3. Realice una punción de 1,2 mm en el centro de la mancha de la muestra con una herramienta adecuada (p. ej., Uni Core Punch de 1,2 mm).

Importante: No use más de un punzón a la vez.

4. Transfiera un disco de 1,2 mm a cada reacción. No mezcle la reacción después de transferir el disco.
5. Prepare los controles positivos y negativos.

Control positivo: Utilice 1 µL de ADN de control (5 ng/µL).

Nota: Si las señales son demasiado bajas o demasiado altas en las PCRs posteriores, puede que necesite adaptar la cantidad de ADN control para su laboratorio tras ajustar el número de ciclo de PCR óptimo. No añada un disco en blanco al pocillo de control positivo.

Control negativo: No añada ADN molde al control negativo. No añada un disco en blanco o agua al tubo o pocillo de PCR del control negativo.

6. Centrifugue brevemente las reacciones para asegurarse de que los discos estén totalmente sumergidos.
7. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante aplicando las condiciones descritas en la Tabla 25.
8. Cuando haya finalizado el protocolo, almacene las muestras a una temperatura de -30 °C a -15 °C protegidas de la luz o continúe directamente con la electroforesis. Añada 1 µL del producto de PCR directamente a 12 µL de Hi-Di Formamide más el estándar de tamaño. Inicie la corrida en el analizador.

Tabla 25. Protocolo de ciclado recomendado para células bucales en FTA y otro papel

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 °C*	12 min	–
96 °C	10 s	
60 °C	1 min 25 s	27 ciclos
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	–
60 °C	5 min	–
10 °C	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Protocolo: Amplificación mediante PCR de lisados de hisopados bucales

Este protocolo está indicado para la amplificación directa de loci STR mediante PCR con el Investigator Argus Y-28 QS Kit a partir de muestras de lisados de hisopados bucales.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona distinta a la utilizada para el aislamiento de ADN y el análisis del producto de PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos que contienen los componentes de la PCR, agite en vórtex y centrifugue brevemente los tubos para colectar el contenido en el fondo.

Procedimiento

1. Coloque el hisopo en un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
Corte, separe y expulse el extremo del hisopo.
2. Añada 500 µL de STR GO! Lysis Buffer a la muestra.
3. Incube la muestra a 95 °C durante 5 min agitando a 1200 rpm en un thermomixer.
4. Prepare una mezcla maestra de acuerdo con la Tabla 26 (para PCR de volumen completo) o de acuerdo con la Tabla 27 (para PCR de volumen reducido).

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR. Prepare un volumen de mezcla de reacción un 10 % mayor que el requerido para el número total de ensayos de PCR que se van a realizar. Tal volumen debería incluir las reacciones de control positivo y negativo.

Tabla 26. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen completo

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	7,5 µL
Primer Mix	2,5 µL
Nuclease-free water	10,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	20,0 µL

Tabla 27. Configuración de mezcla maestra recomendada para PCR de volumen reducido

Componente	Volumen por reacción
Fast Reaction Mix 3.0	3,75 µL
Primer Mix	1,25 µL
Nuclease-free water	5,0 µL
Volumen de reacción total por muestra	10,0 µL

5. Agite en vórtex la mezcla de reacción meticulosamente y dispense el volumen de reacción total necesario por cada muestra en tubos de PCR o en los pocillos de una placa de PCR.
6. Mezcle el lisado del hisopado meticulosamente. Transfiera 2 µL (ara volumen de reacción completo) o 1 µL (para volumen de reacción reducido) de lisado de frotis directamente a cada reacción.
7. Prepare los controles positivos y negativos.
Control positivo: Utilice 1 µL de ADN de control (5 ng/µL).
Nota: Si las señales son demasiado bajas o demasiado altas en la PCR posterior, puede que necesite adaptar la cantidad de ADN control para su laboratorio tras ajustar el número de ciclo de PCR óptimo.
Control negativo: Use un lisado de frotis blanco.
8. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante aplicando las condiciones descritas en la Tabla 28.
9. Cuando haya finalizado el protocolo, almacene las muestras a una temperatura de -30 °C a -15 °C protegidas de la luz o continúe directamente con la electroforesis. Añada 1 µL del producto de PCR directamente a 12 µL de Hi-Di Formamide más el estándar de tamaño. Inicie la corrida en el analizador.

Tabla 28. Protocolo de ciclado recomendado para lisados de frotis bucales

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 °C*	12 min	–
96 °C	10 s	
60 °C	1 min 25 s	27 ciclos
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	–
60 °C	5 min	–
10 °C	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Apéndice D: Amplificación Rápida de ADN a partir de Muestras de Referencia con el Investigator Argus Y-28 QS Kit

Protocolo: Amplificación por PCR

Este protocolo sirve para la amplificación por PCR de los locus STR de muestras forenses de referencia extraídas con el Investigator Argus Y-28 QS Kit.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Prepare todas las mezclas de reacción en una zona distinta a la utilizada para el aislamiento de ADN y el análisis del producto de PCR (análisis post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrófobos para reducir al mínimo el riesgo de contaminación cruzada.
- La cantidad recomendada de ADN en condiciones normales es de 0,5 ng a 1 ng. Para muestras que contengan menos ADN y para mezclas, se recomiendan los protocolos de ciclado estándar.

Antes de comenzar

- Antes de abrir los tubos que contienen los componentes de la PCR, agítelos en vórtex y centrifúgelos brevemente para coleccionar el contenido del fondo de los tubos.

Procedimiento

1. Descongele los componentes PCR y el ácido nucleico molde.
Mezcle bien. Centrifugue brevemente antes de su uso.
2. Prepare la mezcla maestra según la Tabla 29.

La mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios para la PCR, excepto el ADN molde (muestra) y agua libre de nucleasas.

Dado que puede producirse cierto grado de pérdida de reactivos durante las transferencias, prepare la mezcla con las reacciones adicionales incluidas. Incluya también reacciones de control positivo y negativo.

3. Agite en vórtex la mezcla maestra meticulosamente, centrifugue de forma breve y dispense volúmenes adecuados en tubos de PCR o en los pocillos de una placa de PCR.
4. Añada el ADN molde y agua libre de nucleasas a la mezcla maestra hasta obtener un volumen de muestra final de 25 μL .
5. Prepare controles positivos y negativos.

Control positivo: Use 5 μL de ADN de control (es decir, 0,5 ng).

Control negativo: para la reacción, utilice agua libre de nucleasas en lugar de ADN molde.

Tabla 29. Preparación de las reacciones

Componente	Volumen por reacción
Fast reaction mix 3.0	7,5 μL
Primer mix	2,5 μL
Nuclease-free water (añadida en el paso 4)	Variable
ADN molde (añadido en el paso 4)	Variable
Volumen total	25 μL

6. Si se ha pipeteado ADN molde en el borde o la tapa del tubo de PCR, centrifugue brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
7. Programe el termociclador según las instrucciones del fabricante aplicando las condiciones descritas en la Tabla 30.
8. Cuando haya finalizado el protocolo de ciclado, almacene las muestras a una temperatura entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz o continúe directamente con la electroforesis.

Tabla 30. Protocolo de ciclado rápido recomendado para muestras de referencia extraídas

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
96 °C*	10 min	–
96 °C	10 s	30 ciclos
61,5 °C	55 s	
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	–
60 °C	5 min	–
10 °C	∞	–

* Inicio caliente para activar la ADN polimerasa.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
Investigator Argus Y-28 QS Kit (100)	Primer mix, fast reaction mix 3.0, control DNA, allelic ladder Argus Y-28, DNA Size Standard, and nuclease-free water	383625
Investigator Argus Y-28 QS Kit (400)	Primer mix, fast reaction mix 3.0, control DNA, allelic ladder Argus Y-28, DNA Size Standard, and nuclease-free water	383627
Productos relacionados		
Matrix Standard BT6 (50)	Matrix standard for 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP, and BTO, para Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers	386224
Investigator STR GO! Lysis Buffer (200)	Tampón de lisis para 200 muestras de hisopo	386516
Investigator STR GO! Punch Buffer (200)*	Tampón de lisis para 200 muestras de células epiteliales o sangre en papel	386526
UniCore Punch Kit 1.2 mm	4 unidades	WB100028
Kits de cuantificación Investigator		
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Para su uso con los sistemas Applied Biosystems 7500 Real-Time: Quantiplex Pro Reaction Mix, Quantiplex Pro Primer Mix, Quantiplex Pro Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387216

Producto	Contenido	N.º de cat.
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Para su uso con los sistemas QIAGEN RotorGene Q Real-Time : Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix, Quantiplex Pro RGQ Primer Mix, Male Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316

* Kits de mayor tamaño están disponibles ; consulte al respecto.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías de usuario del kit de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Fecha	Cambios
06/2021	Revisión inicial

Notas

Acuerdo de licencia limitada para el Investigator Argus Y-28 QS Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual de uso y en los protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a toda responsabilidad respecto a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos de licencia actualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamplifier®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); Biometra® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (The United States Department of Health and Human Services); Applied Biosystems®, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, Hi-Di™, POP.4®, Veriti® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la ley.

06/2021 HB-2897-001 © 2021 QIAGEN. Todos los derechos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com