

Febbraio 2021

Manuale Investigator[®] 24plex QS

Per l'amplificazione multiplex dei loci nucleari
CODIS, della serie europea standard di loci,
più SE33, DYS391 e amelogenina

Sommario

Contenuto del kit	3
Trasporto e conservazione	4
Uso previsto.....	4
Informazioni sulla sicurezza	5
Controllo di qualità.....	5
Introduzione.....	6
Attrezzature e reagenti richiesti ma non forniti dall'utente.....	9
Protocollo: amplificazione mediante PCR	11
Protocollo: elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer.....	14
Protocollo: analisi	29
Software di analisi	29
Controlli	30
Sensore di qualità	31
Guida alla risoluzione dei problemi	38
Riferimenti	41
Appendice A: Interpretazione dei risultati	42
Appendice B: variazione dei volumi di PCR quando si utilizza l'Investigator 24plex QS Kit	43
Informazioni per gli ordini	44
Cronologia delle revisioni del documento.....	46

Contenuto del kit

Investigator 24plex QS Kit	(100)	(400)
Numero di catalogo	382415	382417
Numero di reazioni da 25 µl	100	400
Fast Reaction Mix 2.0*	750 µl	4 x 750 µl
Nuclease-free water (Acqua priva di nucleasi)	1,9 ml	4 x 1,9 ml
Primer Mix 24plex QS	250 µl	4 x 250 µl
Control DNA 9948 (0,1 ng/µl)	200 µl	200 µl
DNA Size Standard 24plex (BTO)	55 µl	220 µl
Allelic ladder 24plex (Ladder allelico 24plex)	25 µl	3 x 25 µl
Quick-Start Protocol (Protocollo Quick-Start)	1	1

* Contiene DNA polimerasi, dNTP, MgCl₂ e sieroalbumina bovina (BSA).

Trasporto e conservazione

L'Investigator 24plex QS Kit viene spedito in ghiaccio secco. Al ricevimento deve essere immediatamente conservato in un freezer a temperatura costante compresa tra -30 e -15°C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. La miscela di primer e il ladder allelico devono essere conservati al riparo dalla luce. I campioni di DNA e i reagenti post-PCR (ladder allelico e dimensioni standard del DNA) vanno conservati separatamente dai reagenti PCR. In queste condizioni, i componenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit.

Dopo l'apertura, l'Investigator 24plex QS Kit può essere conservato a 2-8°C per un massimo di 6 mesi.

Uso previsto

L'Investigator 24plex QS Kit è destinato ad applicazioni di biologia molecolare per analisi di medicina legale e test dell'identità umana e della paternità. Il presente prodotto non è destinato a diagnosi, prevenzione o trattamento di malattie.

Manipolare i prodotti con la massima cura e attenzione. Consigliamo a tutti gli utenti dei prodotti QIAGEN® di aderire alle linee guida NIH che sono state sviluppate per gli esperimenti con DNA ricombinante o ad altre linee guida appropriate.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio idoneo, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (Safety Data Sheets, SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit QIAGEN e di ogni relativo componente.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto dell'Investigator 24plex QS Kit è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto. Gli Investigator 24plex QS Kit soddisfano i requisiti ISO 18385.

Introduzione

L'Investigator 24plex QS Kit viene utilizzato per la PCR Multiplex nelle analisi di medicina legale e nei test dell'identità umana e della paternità. La PCR amplifica contemporaneamente i 22 marcatori STR polimorfici elencati di seguito insieme al marcatore amelogenina sesso-specifico. Questi 22 marcatori sono consigliati dal gruppo di lavoro denominato "CODIS (Combined DNA Index System) Core Loci Working Group", dalla Rete europea degli Istituti di Scienza Forense (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) e dal gruppo europeo per la profilazione del DNA (European DNA Profiling Group, EDNAP).

La miscela di primer dell'Investigator 24plex QS Kit contiene due nuovi controlli interni per PCR (i sensori di qualità QS1 e QS2), che forniscono informazioni utili sull'efficienza della PCR e sulla presenza di inibitori della PCR. I sensori di qualità vengono amplificati contemporaneamente ai marcatori STR polimorfici.

L'Investigator 24plex QS Kit è stato sviluppato specificamente per la generazione rapida e affidabile di profili di DNA a partire da campioni di sangue, tamponi orali e macchie di sangue forensi. Il kit utilizza la tecnologia PCR a ciclo rapido di QIAGEN, che consente l'amplificazione in circa 60 minuti e fornisce risultati altamente affidabili mediante analisi chimiche resistenti agli inibitori. I primer sono marcati a fluorescenza con i seguenti coloranti:

- 6-FAM™: Amelogenina, TH01, D3S1358, vWA, D21S11
- BTG: TPOX, DYS391, D1S1656, D12S391, SE33
- BTY: D10S1248, D22S1045, D19S433, D8S1179, D2S1338
- BTR2: D2S441, D18S51, FGA
- BTP: QS1, D16S539, CSF1PO, D13S317, D5S818, D7S820, QS2

La quantità raccomandata di DNA in condizioni standard è di 0,5 ng. Le validazioni interne hanno dimostrato risultati molto affidabili ed equilibrati con 0,2–2 ng di DNA, e risultati affidabili con <0,1 ng di DNA.

L'Investigator 24plex QS Kit è stato convalidato mediante il GeneAmp® PCR System 9700 (con blocco in argento placcato oro a 96 pozzetti) e Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer.

La Tabella 1 mostra i loci STR con la relativa mappatura cromosomica e i motivi ripetuti, che sono concordi alle linee-guida della International Society for Forensic Genetics (ISFG) per l'uso di marcatori microsatelliti (1).

Per informazioni sulle microvarianti non contenute nel ladder allelico dell'Investigator 24plex, consultare il sito web del National Institute of Standards and Technology (NIST) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Tabella 1. Dati specifici per loco del Investigator 24plex QS Kit

Loco	Numero di accesso a GenBank®	Motivo ripetuto dell'allele di riferimento	Mappatura cromosomica
Amelogenina X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amelogenina Y	M55419	–	Yp11.2
DYS391	AC011302	[TCTA] ₁₁	Yq11.21
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] ₁₆ [TGA][TAGA][TAGG] ₁ [TG] ₅	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] ₁₂	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	3p25.3
D5S818	G08446	[AGAT] ₁₁	5q23.2
D7S820	G08616	[GATA] ₁₂	7q21.11
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] ₁₃	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	12p13.2
D13S317	G09017	[TATC] ₁₃	13q31.1

La tabella continua nella pagina successiva

La tabella continua dalla pagina precedente

Loco	Numero di accesso a GenBank	Motivo ripetuto dell'allele di riferimento	Mappatura cromosomica
D16S539	G07925	[GATA] ₁₁	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] ₁₁	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	22q12.3
CSF1PO	X14720	[AGAT] ₁₂	5q33.1
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
TPOX	M68651	[AATG] ₁₁	2p25.3
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Attrezzature e reagenti richiesti ma non forniti dall'utente

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio idoneo, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Tutti i protocolli

- Hi-Di™ Formamide, 25 ml (Applied Biosystems n. cat. 4311320)
- Matrix Standard BT6 per strumenti multicapillari, come, ad es., gli analizzatori genetici della serie 3500 (vedasi Informazioni per gli ordini)
- Pipette e puntali per pipette
- Uno dei seguenti analizzatori per DNA: *
 - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- Uno dei seguenti termociclatori PCR: *
 - QIAamplifier® 96
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
 - ProFlex™ 96-well PCR System
 - Bio-Rad® PTC-200
 - Biometra UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Provette o piastre PCR
- Microcentrifuga per provette o piastre PCR

* Questo elenco non è esaustivo e non include molti importanti fornitori di materiali biologici.

Validità del software di analisi per i prodotti per l'identificazione umana

Gli Investigator Human Identification PCR Kit devono essere calibrati con un ladder allelico. Pertanto il software usato deve essere compatibile con i prodotti per identificazione umana per applicazioni forensi. Si consiglia il GeneMapper® *ID-X* Software. I file modello dell'Investigator agevolano l'analisi dei dati e sono validi con il suddetto software.

Protocollo: amplificazione mediante PCR

Questo protocollo serve per l'amplificazione mediante PCR dei loci STR di campioni forensi eseguita mediante l'Investigator 24plex QS Kit.

Aspetti importanti da considerare prima di iniziare

- Preparare tutte le miscele di reazione in un'area separata da quella utilizzata per l'isolamento del DNA e per l'analisi dei prodotti PCR (analisi post-PCR).
- Utilizzare puntali monouso con filtri idrofobici per ridurre al minimo i rischi di contaminazione crociata.
- La quantità raccomandata di DNA in condizioni standard è di 0,5 ng. Le validazioni interne hanno dimostrato risultati molto affidabili ed equilibrati con 0,2–2 ng di DNA, e risultati affidabili con <0,1 ng di DNA.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Prima di aprire le provette contenenti i componenti della PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

Procedura

1. Scongellare i componenti per PCR e l'acido nucleico stampo.

Miscelare accuratamente. Centrifugare brevemente prima dell'uso.

2. Preparare una miscela master come indicato nella Tabella 2.

La miscela master contiene tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del DNA stampo (campione) e dell'acqua priva di nucleasi.

Poiché si potrebbe perdere del reagente durante i travasi, preparare la miscela per una maggiore quantità di reazioni. Includere inoltre le reazioni di controllo positivo e negativo.

3. Agitare accuratamente la miscela master su vortex, centrifugare brevemente e distribuirne idonei volumi nelle provette per PCR o nei pozzetti di una piastra per PCR.

4. Aggiungere alla miscela master DNA stampo e acqua priva di nucleasi in modo da ottenere un campione finale del volume di 25 μ l.
5. Preparare i controlli positivi e negativi.
 - Controllo positivo: utilizzare 5 μ l di DNA di controllo (cioè 500 pg).
 - Controllo negativo: nella reazione, usare acqua priva di nucleasi invece di DNA stampo.

Tabella 2. Setup della reazione

Componente	Volume per reazione
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 μ l
Miscela di primer	2,5 μ l
Acqua priva di nucleasi (aggiunta nel passaggio 4)	Variabile
DNA stampo (aggiunto nel passaggio 4)	Variabile
Volume totale	25 μ l

6. Se il DNA stampo è stato pipettato sul bordo o sul coperchio della provetta per PCR, centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
7. Programmare il termociclatore nel rispetto delle istruzioni del produttore, adottando le condizioni descritte nella Tabella 3.

Nota: se si usa il GeneAmp PCR System 9700 con un blocco in alluminio, usare la modalità "Std Mode" (Modo std) oppure, con un blocco in argento a 96 pozzetti o blocco in argento placcato oro a 96 pozzetti, usare la modalità "Max Mode" (Modo max). Non usare "9600 Emulation Mode" (Modo emulazione 9600).

8. Dopo aver completato il protocollo di ciclaggio, conservare i campioni a una temperatura compresa tra -30 e -15°C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'elettroforesi.

Tabella 3a. Protocollo di ciclaggio standard

Temperatura	Durata	Numero di cicli
98°C*	30 s	
64°C	55 s	3 cicli
72°C	5 s	
96°C	10 s	
61°C	55 s	27 cicli
72°C	5 s	
68°C	5 min	–
60°C	5 min	–
10°C	∞	–

* Avvio a caldo per attivare la DNA polimerasi.

Tabella 3b. Protocollo di ciclaggio facoltativo

Temperatura	Durata	Numero di cicli
98°C*	30 s	
64°C	55 s	3 cicli
72°C	5 s	
96°C	10 s	
61°C	55 s	27 cicli
72°C	5 s	
68°C	2 min	–
60°C	2 min	–
10°C	∞	–

* Avvio a caldo per attivare la DNA polimerasi.

La Tabella 3b illustra in dettaglio le condizioni di ciclaggio pubblicate in precedenza che potrebbero continuare a essere utilizzate se l'adenilazione incompleta non è visibile all'interno degli elettroferogrammi.

Protocollo: elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

L'Investigator 24plex QS Kit è stato convalidato per l'uso sull'analizzatore genetico 3500/3500XL, che richiede il seguente software:

- 3500 Data Collection Software v1 o v2
- HID Updater 3500 Data Collection v2.0

Nota: per la scrittura dei dati sui file corretti, l'utente deve collegarsi al PC come amministratore locale o con diritti di accesso equivalenti.

Per istruzioni dettagliate sulla configurazione dello strumento, sulla calibrazione spettrale o sull'applicazione dell'Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software v1 o v2 e del GeneMapper *ID-X* Software v1.2, consultare la *Guida all'uso degli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

L'apparecchio con 8 capillari è l'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. L'apparecchio con 24 capillari è l'Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

Il set di filtri virtuali AnyDye è usato per l'applicazione combinata dei 6 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO. Questo standard matrice è BT6.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati nella Tabella 4.

Tabella 4. Materiali occorrenti per l'elettroforesi

Materiale	Specifiche
Capillare	Serie da 36 cm per lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polimero	POP-4® per gli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Tampone	Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Prima di eseguire l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA, eseguire una calibrazione spettrale con i 6 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO per ciascun analizzatore (Tabella 5). La procedura di calibrazione crea una matrice che viene utilizzata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

Importante: La calibrazione spettrale deve essere eseguita per ogni nuova serie capillare. Comprende i seguenti passaggi:

- Preparazione dello strumento
- Preparazione della piastra di calibrazione standard
- Assemblaggio e caricamento della piastra nello strumento
- Preparazione via software del set di coloranti BT6
- Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale
- Controllo della matrice

Preparazione dello strumento

Prima di eseguire il processo di calibrazione spettrale, verificare che la calibrazione spaziale sia stata eseguita. Il processo è descritto in maniera dettagliata nella *Guida all'uso degli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Tabella 5. I 6 marker fluorescenti del BT6

Colore	Standard matrice
Blu (B)	6-FAM
Verde (G)	BTG
Giallo (Y)	BTY
Rosso (R)	BTR2
Viola (P)	BTP
Arancione (O)	BTO

Preparazione della piastra di calibrazione standard per 8 capillari (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
2. Preparare una miscela di formammide e Matrix Standard BT6 secondo la Tabella 6.

Tabella 6. Preparazione della miscela di formammide e Matrix Standard BT6 per 8 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	90 µl
Matrix Standard BT6 multi cap.	10 µl

3. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
4. Caricare 10 µl della miscela in ciascuno degli 8 pozzetti di una piastra da 96 pozzetti nelle posizioni da A1 a H1.
5. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
6. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.
In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4°C.

Preparazione della piastra di calibrazione standard per 24 capillari (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

7. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
8. Preparare una miscela di formammide e Matrix Standard BT6 secondo la Tabella 7.

Tabella 7. Preparazione della miscela di formammide e Matrix Standard BT6 per 24 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	225 µl
Matrix Standard BT6 multi cap.	25 µl

9. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
10. Caricare 10 µl della miscela in ciascuno dei 24 pozzetti di una piastra da 96 pozzetti nelle posizioni A1–H1, A2–H2 e A3–H3.
11. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
12. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.
In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4°C.

Assemblaggio piastra e caricamento piastra nello strumento

Le fasi necessarie sono descritte dettagliatamente nella *Guida all'uso degli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Preparazione via software del set di coloranti BT6

Prima di eseguire la calibrazione spettrale, impostare un set di coloranti per Matrix Standard BT6.

1. Per creare un nuovo set di coloranti, selezionare "Library" (Libreria). Alla voce "Analyze" (Analizza) selezionare "Dye Sets" (Set di coloranti) e fare clic su "Create" (Crea).

2. Inserire un "Dye Set Name" (Nome set coloranti), ad esempio BT6.
3. Alla voce "Chemistry" (Chimica), selezionare "Matrix Standard" (Standard matrice) e come "dye set template" (Modello set di coloranti) selezionare "AnyDye Template" (Modello per qualsiasi colorante).
4. Alla voce "Calibration Peak Order" (Ordine piccho di calibrazione) disporre i colori come segue: 6 – blu, 5 – arancione, 4 – verde, 3 – giallo, 2 – rosso, 1 – viola.

Nota: questa è l'impostazione corretta dell'ordine dei picchi nello strumento, anche se l'ordine dei picchi del Matrix Standard BT6 è diverso.

5. Modificare le impostazioni "Parameters" (Parametri) come segue:

Matrix Condition Number Upper Limit (Limite superiore per il numero di condizionamento della matrice): 13,5

Locate Start Point After Scan (Individuare il punto di inizio dopo la scansione): 1000

Locate Start Point Before Scan (Individuare il punto di inizio prima della scansione): 5000

Limit Scans To (Limitare le scansioni a): 2750

Sensitivity (Sensibilità): 0,4

Minimum Quality Score (Punteggio minimo per la qualità): 0,95

6. Fare clic su "Save" (Salva) per confermare le modifiche.

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. Configurazione del set di coloranti BT6

Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale

Dopo aver posizionato le piastre a pozzetti multipli che contengono la miscela di calibrazione spettrale sul vassoio dell'autocampionatore, è possibile avviare il processo di calibrazione spettrale.

7. Per accedere alla schermata della calibrazione spettrale, selezionare "Maintenance" (Manutenzione) sul dashboard (cruscotto) del 3500 Series Data Collection Software.
8. Per impostare un ciclo di calibrazione andare a "Calibrate" (Calibra), seguito da "Spectral" (Spettrale) e selezionare "Calibration Run" (Ciclo di calibrazione).
9. È necessario specificare il numero di pozzetti della piastra di calibrazione spettrale e la loro posizione nello strumento.
10. Alla voce "Chemistry Standard" (Analisi chimica standard) selezionare "Matrix Standard" (Standard matrice) e come "Dye Set" (Set di coloranti) selezionare il BT6 precedentemente creato (vedere "Preparazione via software del set di coloranti BT6", pagina 17).
11. Abilitare (opzionale) "Allow Borrowing" (Consenti acquisizione).
12. Fare clic su "Start Run" (Avvia processo).

Controllo della matrice

Fare clic su un capillare nella tabella per visualizzare i risultati relativi a quel capillare sotto la tabella "Results" (Risultati) [{"Capillary" (Capillare), "Quality value" (Valore qualità) e "Condition Number" (Numero di condizionamento)].

- Il valore qualità (valore Q) di ogni capillare deve essere superiore a 0,95 e il numero di condizione (valore C) deve essere compreso tra 1 e 13,5.
- Controllare se i campioni matrice hanno una baseline piatta. Come mostrato nella Figura 2, ci dovrebbero essere 6 picchi con altezze di circa 1.000– 6.000 RFU per ogni campione di matrice. (**Nota:** il range ottimale è 3.000-5.000 RFU).

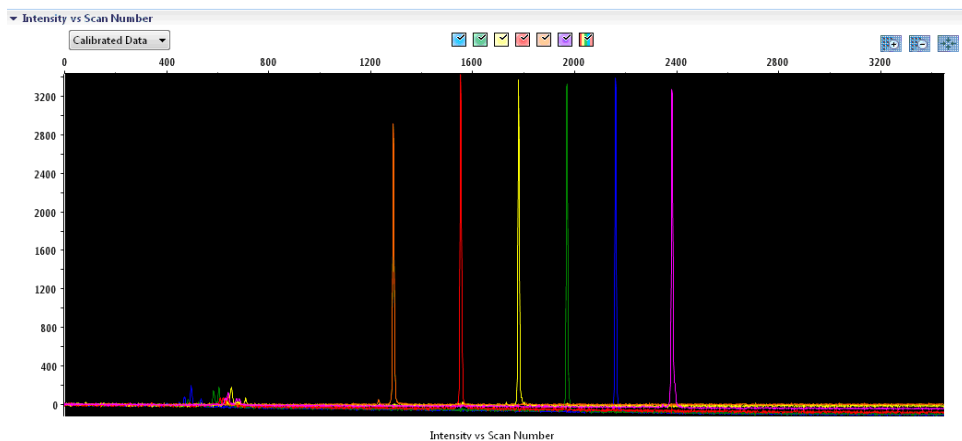


Figura 2. Elettroferogramma di calibrazione spettrale del Matrix Standard BT6 su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Al termine della calibrazione spettrale, sulla riga "Overall" (Generale) compaiono i risultati in verde (Figura 3). Se sulla riga "Overall" (Generale) i risultati sono visualizzati in rosso, consultare la sezione "Risoluzione dei problemi di calibrazione spettrale" della *Guida all'uso degli 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. Esempio di calibrazione spettrale corretta del Matrix Standard BT6 per tutti i capillari su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Per ciascun capillare, selezionare e visualizzare i dati dello spettro e grezzi. Verificare che i dati soddisfino i seguenti requisiti:

- L'ordine dei picchi nel profilo spettrale letto da sinistra a destra deve apparire arancione-rosso-giallo-verde-blu-viola.
- Nel profilo dei dati grezzi non deve comparire nessun picco estraneo.
- La morfologia dei picchi del profilo spettrale non deve presentare sovrapposizioni, cadute, né altre irregolarità. I picchi devono essere visibili, separati e distinti.

Se i dati di tutti i capillari soddisfano i suddetti requisiti, fare clic su "Accept" (Accetta). In caso di dati che non soddisfano i suddetti requisiti, fare clic su "Reject" (Rifiuta) e consultare la sezione "Risoluzione dei problemi di calibrazione spettrale" della *Guida all'uso degli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide).

Preparazione dei campioni

1. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
2. Preparare una miscela di formammide e dimensioni standard del DNA come indicato nella Tabella 8.
3. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
4. Ripartire 12 µl di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.
5. Aggiungere 1 µl di prodotto PCR o ladder allelico (diluire, se necessario).
6. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
7. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.
8. In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4°C.
9. Caricare i campioni sul vassoio.

Tabella 8. Preparazione di una miscela di formammine e dimensioni standard del DNA

Componente	Volume per campione
Hi-Di Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 24plex (BTO)	0,5 µl

Nota: poiché le iniezioni vengono eseguite contemporaneamente su tutti i capillari, occorre pipettare almeno 1 colonna intera (protocollo da 8 campioni) o 3 colonne intere (protocollo da 24 campioni) sulla piastra degli analizzatori multicapillari. Se si analizza un numero inferiore di campioni, le posizioni vuote devono essere riempite con 12 µl di Hi-Di Formamide.

Per l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, iniettare un ladder allelico per ciascuna serie di 24 campioni:

- Strumenti a 8 capillari: un ladder allelico ogni 3 iniezioni
- Strumenti a 24 capillari: un ladder allelico ogni iniezione

Importante: l'effettiva temperatura dell'ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti per PCR usati negli strumenti multicapillari, perciò si possono avere picchi con spalla (shoulder peaks) o picchi divisi, specie a basse temperature. **Verificare che le condizioni dell'ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento.** Inoltre, accertarsi che i tamponi siano equilibrati alle condizioni dell'ambiente.

Configurazione di un processo

Se si utilizza per la prima volta un Investigator 24plex QS Kit su un Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, prima si dovranno impostare vari protocolli:

- Protocollo strumento
- Dimensioni standard
- Protocollo QC
- Esame

Tutti i protocolli possono essere impostati tramite il dashboard del 3500 Series Data Collection Software.

Protocollo strumento

1. Per impostare il protocollo dello strumento, selezionare "Library" (Libreria) e poi, alla voce "Analyze" (Analizza), andare a "Instrument Protocols" (Protocolli strumenti) e fare clic su "Create" (Crea).

Nota: modificare le impostazioni predefinite del modulo di funzionamento da "HID36_POP4", come mostrato nella Tabella 9.

2. È necessario inserire o selezionare i parametri dalla Tabella 9.
3. Fare clic su "Save" (Salva) per confermare le modifiche.

Tabella 9. Parametri protocollo strumento per Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Parametro	Impostazione 3500	Impostazione 3500xL
Application Type (Tipo di applicazione)	HID	HID
Capillary Length (Lunghezza del capillare)	36 cm	36 cm
Polymer (Polimero)	POP4	POP4
Dye Set (Set di coloranti)	Ad es. BT6	Ad es. BT6
Run Module (Modulo ciclo)	HID36_POP4	HID36_POP4
Protocol Name (Nome protocollo)	Ad es. Investigator 24plex	Ad es. Investigator 24plex
Oven Temperature (Temperatura forno) (°C)	Valore predefinito (60)	Valore predefinito (60)
Run Voltage (Tensione ciclo) (kV)	13,0	13,0
PreRun Voltage (Tensione pre-ciclo) (kV)	Valore predefinito (15)	Valore predefinito (15)
Injection Voltage (Tensione iniezione) (kV)	1,2	1,6
Run Time (Durata ciclo) (s)	1550	1550
PreRun Time (Durata pre-ciclo) (s)	Valore predefinito (180)	Valore predefinito (180)
Injection Time (Durata iniezione) (s)	30,0*	33,0*
Data Delay (Ritardo dati) (s)	Valore predefinito (1)	Valore predefinito (1)
Advanced Options (Opzioni avanzate)	Valore predefinito	Valore predefinito

* Deviando dalle impostazioni standard, la durata dell'iniezione può variare da 1 a 35 s a seconda del tipo di campione. Se sono registrati campioni con intensità altissima del segnale, si può selezionare una durata d'iniezione più breve. Per i campioni a basso tenore di DNA, può essere necessario una durata d'iniezione fino a 35 s.

Dimensioni standard

4. Per impostare Size Standard (Dimensioni standard), selezionare "Library" (Libreria) e poi, alla voce "Analyze" (Analizza), andare a "Size Standard" (Dimensioni standard) e fare clic su "Create" (Crea).

5. È necessario inserire o selezionare i parametri della Tabella 10.

Utilizzare il DNA Size Standard 24plex (BTO) con frammenti delle seguenti lunghezze: 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 e 550 bp.

Tabella 10. Parametri dimensioni standard

Parametro	Impostazione
Size Standard (Dimensioni standard)	Ad es. SST-BTO_60-500bp
Dye Color (Tinta del colorante)	Arancione

6. In alternativa, importare i parametri del DNA Size Standard 24plex (BTO) usando il file modello Investigator raccomandato "SST-BTO_60-500bp" (Tabella 15).

7. Fare clic su "Save" (Salva) per confermare le modifiche.

Protocollo QC

8. Per impostare il protocollo dello strumento, selezionare "Library" (Libreria) e poi, alla voce "Analyze" (Analizza), andare a "QC Protocols" (Protocolli QC) e fare clic su "Create" (Crea).

9. È necessario inserire o selezionare i parametri della Tabella 11.

Tabella 11. Parametri protocollo QC

Parametro	Impostazione
Protocol Name (Nome protocollo)	Ad es., BTO_550
Size Standard (Dimensioni standard)	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

10. Entrare in "Analysis Settings" (Impostazioni analisi), selezionare "Peak Amplitude Threshold" (Soglia di ampiezza picchi) e assicurarsi che tutti i colori siano abilitati.

Verificare le impostazioni consigliate per le analisi nella Tabella 14. Tutte le altre impostazioni devono rimanere quelle predefinite.

11. Fare clic su "Save" (Salva) per confermare le modifiche.

Esame

12. Per impostare un Assay (Esame), andare nella "Library" (Libreria) e, alla voce Manage (Gestisci) andare su Assays (Esami) e fare clic su "Create" (Crea).

13. Per analizzare i frammenti dell'Investigator 24plex, è necessario selezionare i parametri mostrati nella Tabella 12.

14. Fare clic su "Save" (Salva) per confermare le modifiche.

Tabella 12. Parametri dell'esame

Parametro	Impostazione
Assay Name (Nome esame)	Ad es. Investigator 24plex
Color (Colore)	Valore predefinito
Application Type (Tipo di applicazione)	HID
Instrument Protocol (Protocollo strumento)	Ad es. Investigator 24plex
QC Protocols (Protocolli QC)	Ad es., BTO_550

Avviare il ciclo

15. Sul dashboard, fare clic su "Create New Plate" (Crea nuova piastra).

16. Andare a "Setup" (Configura) e quindi a "Define Plate Properties" (Definisci proprietà piastra) e selezionare "Plate Details" (Dettagli piastra). Selezionare o inserire i parametri nella Tabella 13.

Tabella 13. Proprietà piastra

Proprietà	Impostazione
Name (Nome)	Ad es. Investigator 24plex
Number of Wells (Numero di pozzetti)	96
Plate Type (Tipo di piastra)	HID
Capillary Length (Lunghezza del capillare)	36 cm
Polymer (Polimero)	POP4

17. Fare clic su "Assign Plate Contents" (Assegna contenuti piastra) per implementare le modifiche.
18. Inserire il nome campione stabilito in ciascun pozzetto contenente un campione o un ladder allelico. Questo consentirà di identificare la posizione nel pozzetto di ciascun campione ai fini della raccolta e dell'elaborazione dei dati.
19. Alla voce "Assay" (Esame), scegliere l'esame corretto per l'analisi. Se sono stati seguiti i passaggi indicati in "Configurazione di un processo" (vedere da pagina 23 in avanti), fare clic su "Add from Library" (Aggiungi da libreria) e selezionare Investigator 24plex come Instrument Protocol (Protocollo strumento). Tutti i pozzetti a cui è stato assegnato un nome sulla piastra dovranno essere associati a un esame.
20. Ripetere per "File name conventions" (Convenzioni per i nomi dei file) e "Results group" (Gruppo risultati).
21. Selezionare i pozzetti per i quali è necessario specificare un'analisi. Spuntare le caselle accanto ai nomi di "Assay" (Esame), "File name conventions" (Convenzioni per i nomi dei file) e "Results group" (Gruppo risultati) per assegnarli ai pozzetti selezionati.
22. Se non lo si è già fatto, caricare la piastra assemblata nello strumento e chiudere il portello dello strumento per reinizializzarlo. Successivamente fare clic su "Link Plate for Run" (Collega piastra per il ciclo). Nella schermata successiva, inserire il Run Name (Nome ciclo) desiderato e fare clic su "Start Run" (Avvia processo).

Parametri dell'analisi/metodo dell'analisi

La Tabella 14 elenca i parametri raccomandati per l'analisi nel foglio di lavoro Peak Detector (Rilevatore picchi).

Tabella 14. Impostazioni raccomandate per gli Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Parametro	Settings (Impostazioni)
Peak Detection Algorithm (Algoritmo rilevamento picchi)	Advanced (Avanzato)
Ranges (Range)	Analysis (Analisi): Partial Range (Range parziale) Start Point (Punto d'inizio): 1.000; Stop Point (Punto di arresto): 20.000 Sizing (Dimensionamento): All Sizes (Tutte le dimensioni)
Smoothing and Baseline (Levigatura e comparazione dei dati al punto di partenza)	Smoothing (Levigatura): Light (Leggera) Baseline Window (Finestra di baseline): 51 pts (51 punti)
Size Calling Method (Metodo di assegnazione dimensioni)	Local Southern Method (Metodo meridionale locale)
Peak Detection (Rilevamento picchi)	Peak Amplitude Thresholds (Soglie di ampiezza picchi) B:* Y:* G:* R:* P:* O:* Min. Peak Half Width (Semilarghezza del picco min.): 2 pts (2 punti) Polynomial Degree (Grado del polinomio): 3 Peak Window Size (Misura della finestra del picco): 11 pts (11 punti) [†] Soglie di pendenza: 0,0

* La soglia di ampiezza picchi (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minima del picco che può essere rilevata dal GeneMapper ID-X Software. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio.

Raccomandazione: l'altezza minima del picco dovrebbe essere tre volte più elevata del rumore di fondo della baseline.

[†] Solo l'impostazione della misura della finestra del picco è diversa dai valori predefiniti di Applied Biosystems per l'analisi HID.

Protocollo: analisi

Per istruzioni generali sull'analisi automatica di campioni, consultare la Guida all'uso appropriata del GeneMapper *ID-X* Software.

L'individuazione della lunghezza esatta dei prodotti amplificati dipende dal tipo di apparecchio, dalle condizioni dell'elettroforesi e dal DNA size standard usato. A causa della complessità di alcuni loci, la determinazione della taglia dovrebbe essere basata su una distribuzione uniforme dei riferimenti. Utilizzare il DNA Size Standard 24plex (BTO) con frammenti delle seguenti lunghezze: 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 e 550 bp.

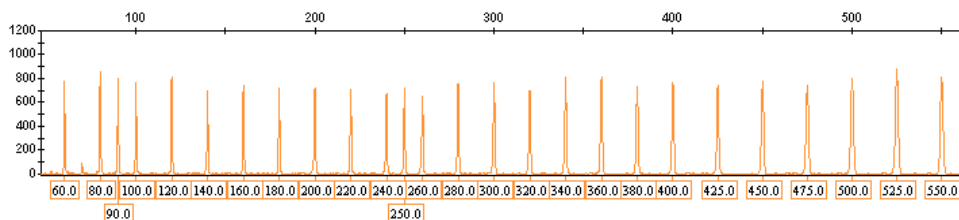


Figura 4. Elettroferogramma del DNA Size Standard 24plex (BTO). Lunghezze dei frammenti in bp.

Software di analisi

L'allocatione degli alleli deve essere effettuata utilizzando un software di analisi idoneo, ad esempio, *GeneMapper ID-X* Software, in abbinamento con i file modello di Investigator, che possono essere scaricati dal sito www.qiagen.com.

Tabella 15. File modello Investigator raccomandati per GeneMapper ID-X

Tipo di file	Nome del file
Pannelli*	24plex_Panels_x
BinSets*	24plex_Bins_x
Stutter	24plex_Stutter_x
Dimensioni standard	SST-BTO_60–500bp
Metodo di analisi	Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Impostazioni per i grafici	Plots_6dyes

* Usare sempre Pannelli e BinSets; gli altri file modello sono facoltativi.

Controlli

Gli alleli elencati nella Tabella 16 rappresentano il Control DNA 9948 (incluso nell'Investigator 24plex QS Kit) e il DNA di altre linee cellulari standard disponibili in commercio.

Per un'ulteriore conferma, la Tabella 16 mostra gli alleli del DNA di riferimento acquistati da Coriell Cell Repositories (CCR) e due DNA di riferimento acquistati da CCR secondo lo standard di Szibor et al. (2).

Tabella 16. Assegnazione degli alleli dell'Investigator 24plex QS Kit

Loco	CCR 9948	CCR 9947A	CCR 3657
Amelogenina	X/Y	X/X	X/Y
DYS391	10/10	–	10/10
D1S1656	14/17	18,3/18,3	13/18,3
D2S441	11/12	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	18/22

La tabella continua nella pagina successiva

La tabella continua dalla pagina precedente

Loco	CCR 9948	CCR 9947A	CCR 3657
D3S1358	15/17	14/15	16/18
D5S818	11/13	11/11	11/11
D7S820	11/11	10/11	10/11
D8S1179	12/13	13/13	15/16
D10S1248	12/15	13/15	14/16
D12S391	18/24	18/20	18/19
D13S317	11/11	11/11	11/13
D16S539	11/11	11/12	13/13
D18S51	15/18	15/19	12/20
D19S433	13/14	14/15	13/14
D21S11	29/30	30/30	28/29
D22S1045	16/18	11/14	11/17
CSF1PO	10/11	10/12	11/11
FGA	24/26	23/24	18/23
SE33	23,2/26,2	19/29,2	22,2/27,2
TH01	6/9,3	8/9,3	7/9,3
TPOX	8/9	8/8	8/11
vWA	17/17	17/18	14/19

Sensore di qualità

L'Investigator 24plex QS Kit contiene due controlli interni per PCR (i sensori di qualità QS1 e QS2), che forniscono informazioni utili sull'efficienza di amplificazione della PCR in generale e sulla presenza di inibitori della PCR. I sensori di qualità interni sono contenuti nella miscela di primer e vengono amplificati contemporaneamente ai marker dei polimorfismi STR. I sensori di qualità sono marcati con BTP e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2).

Per affrontare il problema della similarità della sequenza e la possibilità di un legame non specifico, è stato progettato uno stampo di DNA sintetico del controllo interno utilizzando un algoritmo casuale. La sequenza dello stampo differisce da tutte le sequenze di DNA note e, in particolare, non ha alcuna somiglianza con il DNA umano. La possibilità di un legame non specifico nell'ambito di una reazione di amplificazione della PCR multiplex è quindi molto bassa.

In generale, il successo dell'amplificazione del sensore di qualità piccolo (QS1) indica che la PCR è stata impostata e condotta correttamente, indipendentemente dal fatto che il DNA fosse presente o assente nel campione. Se non viene rilevato nessun sensore di qualità nell'analisi dei prodotti di amplificazione, significa che o il pipettaggio durante la configurazione della PCR o la PCR stessa non sono stati eseguiti correttamente. Ciò indica che l'operatore dovrebbe ripetere l'esperimento per ottenere risultati migliori.

Gli esperimenti condotti sulla sensibilità del sistema hanno rivelato che i controlli interni non hanno effetto sulle prestazioni della PCR. L'amplificazione di basse quantità di DNA stampo ha mostrato risultati simili per le miscele di primer con o senza i sensori di qualità.

Inoltre, l'analisi dei due frammenti di controllo interno, QS1 e QS2, e dei prodotti target di amplificazione degli STR permette l'identificazione differenziale della presenza di inibitori o della presenza di degradazione del DNA in una reazione di amplificazione.

Nel caso della degradazione del campione, l'amplificazione di frammenti bersaglio più piccoli è più efficace dell'amplificazione di frammenti bersaglio più grandi. Tuttavia, la degradazione dello stampo target non ostacola l'amplificazione dei frammenti di controllo interno dallo stampo del controllo interno (Figura 5). Così, un rapporto uguale tra QS1 e QS2, insieme ad un rapporto a favore di piccoli prodotti target di STR, suggeriscono la presenza di degradazione del campione.

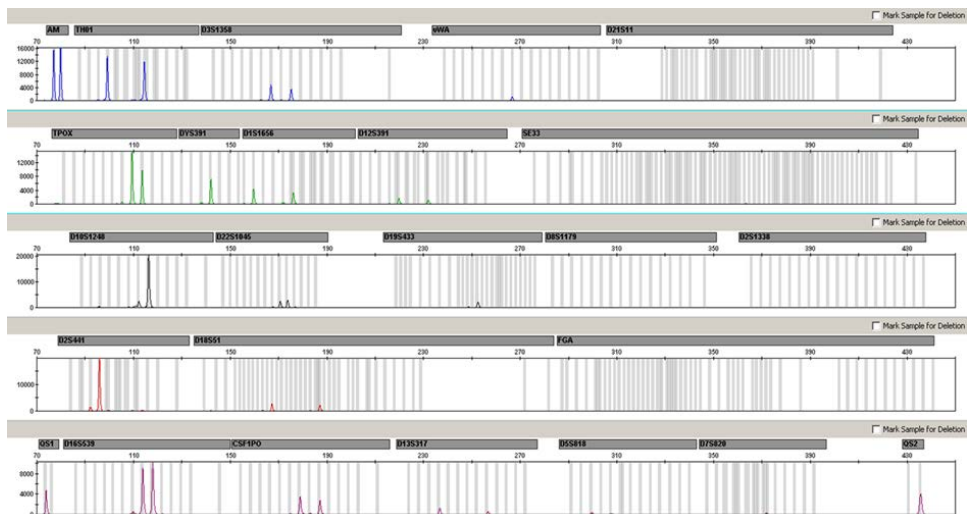


Figura 5. Elettroferogramma dell'analisi STR in presenza di DNA degradato (frammenti di 150 bp). Il DNA genomico è stato tranciato in frammenti di 150 bp mediante ultrasuoni. I frammenti di STR di grandi dimensioni sono stati amplificati con una resa della PCR molto bassa, ma QS1 e QS2 sono stati amplificati normalmente con picchi di pari altezza. I marker sono esposti in alto nell'elettroferogramma. I sensori di qualità sono marcati con BTP (pannello 5) e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2).

Se nel campione sono presenti inibitori come ematina e acido umico, l'amplificazione è meno efficiente e i frammenti di DNA più grandi vengono amplificati meno di quelli piccoli. Se l'analisi dei prodotti di amplificazione indica un'amplificazione inefficiente delle sequenze target di STR maggiori e nel frammento del sensore di qualità (QS2) maggiore, ma il sensore di qualità (QS1) minore viene amplificato bene, è probabile che il campione sia stato contaminato da inibitori. Ciò significa che uno spostamento del rapporto a favore del sensore di qualità piccolo (QS1) suggerisce la presenza di inibitori (Figura 6).

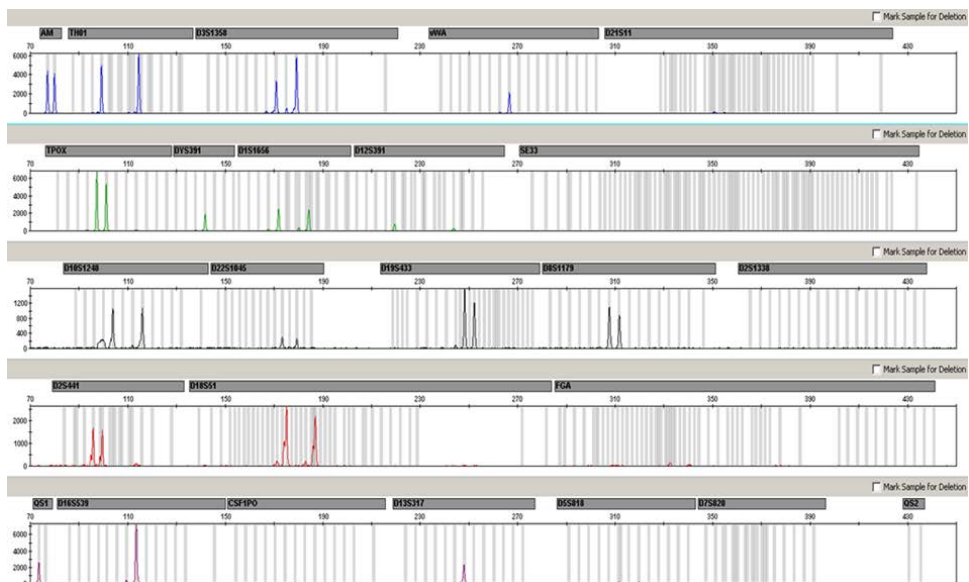


Figura 6. Elettroferogramma dell'analisi degli STR in presenza di ematina. I 22 marcatori di polimorfismi STR, amelogenina, e i due sensori di qualità sono stati amplificati in presenza di 1000 μM di ematina e analizzati mediante elettroforesi capillare. L'amplificazione di frammenti ad alto peso molecolare, compresi i marcatori STR superiori a 250 bp e QS2, è stata inibita dall'elevato contenuto di ematina. I marcatori sono esposti in alto nell'elettroferogramma. I sensori di qualità sono marcati con BTP (pannello 5) e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2, non visibile).

L'analisi della presenza dei due sensori di qualità permette all'utente di identificare in modo differenziato la presenza di inibitori della PCR o il verificarsi di una degradazione nel campione forense. Il che fornisce informazioni utili per l'interpretazione dei dati e per la pianificazione delle fasi successive. La Tabella 17 riassume i possibili aspetti dei profili e i loro significati.

Tabella 17. Aspetti dei profili e loro significato

Picchi degli alleli	QS1	QS2	Interpretazione
Presente	Presente	Presente	Profilo riuscito
Assente	Presente	Presente	Assenza di DNA
Assente	Assente	Assente	PCR non riuscita
Profilo a pendenza elevata	Presente	Riduzione	Presenza di inibitori
Profilo a pendenza elevata	Presente	Presente	DNA degradato

Nota: le altezze dei picchi di QS1 e QS2 possono variare leggermente tra diversi esperimenti. Una leggera dispersione dell'altezza del picco è normale e non dipende dall'influenza dell'inibitore. Durante la validazione, l'analista dovrebbe valutare il normale spettro delle variazioni in relazione al tipo di campioni abitualmente analizzati e poi definire una gamma di altezze dei picchi regolare per entrambi i QS.

Una riduzione del segnale QS2 al di sotto del 20% del segnale QS1 indica l'inibizione della reazione della PCR.

Alleli

La Tabella 18 mostra gli alleli del ladder allelico. Tutte le analisi sono state eseguite usando il polimero POP-4 (Tabella 18 e Figura 7). Con strumenti per analisi, dimensioni standard DNA o polimeri differenti, la lunghezza dei frammenti può risultare diversa. Si raccomanda inoltre un allineamento visivo con il ladder allelico.

Scala

- Orizzontale: 70-470 bp
- Verticale: secondo l'intensità del segnale

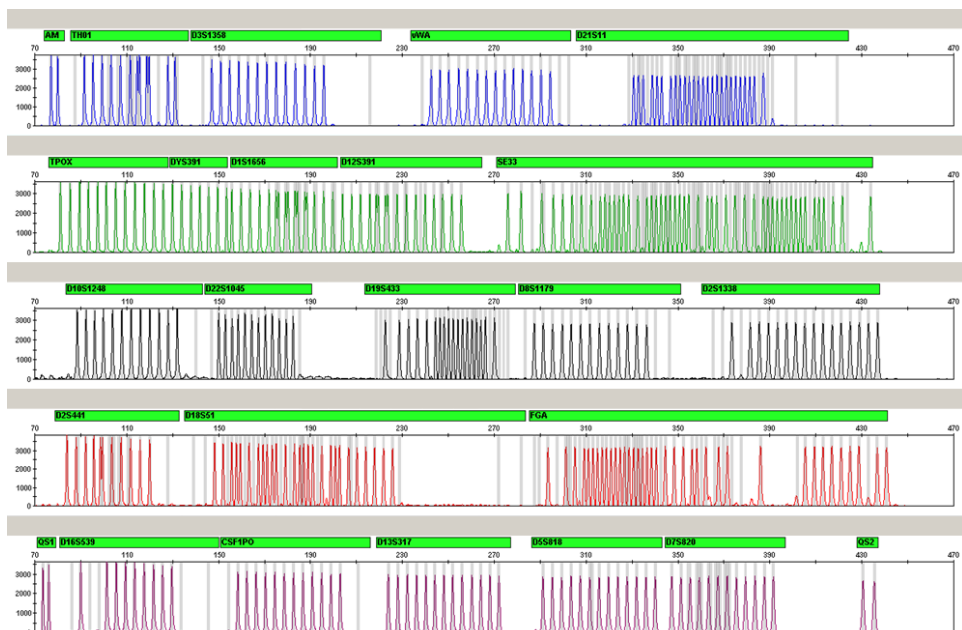


Figura 7. Elettroferogramma del ladder allelico 24plex analizzato su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. Il ladder allelico contiene due alleli per ciascun sensore di qualità (QS1 e QS2). Questo permette l'individuazione automatica dei picchi QS per l'analisi del campione.

Tabella 18. Frammenti di ladder allelico inclusi nel ladder allelico 24plex

Loco	Marcatore colorante	Numeri ripetuti ladder allelico
Amelogenina	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 10.3, 11, 13, 13.3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	6-FAM	24, 24.2, 25, 26, 26.2, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 36.2, 37, 38

La tabella continua nella pagina successiva

La tabella continua dalla pagina precedente

Loco	Marcatore colorante	Numeri ripetuti ladder allelico
TPOX	BTG	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
DYS391	BTG	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D1S1656	BTG	10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19.3, 20.3
D12S391	BTG	14, 15, 16, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
SE33	BTG	3, 4.2, 6.3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23.2, 24.2, 25, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 36, 36.2, 37, 38, 39, 42
D10S1248	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D19S433	BTY	6.2, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR2	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR2	8, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 17.2, 18, 18.2, 19, 20, 21, 21.2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
FGA	BTR2	14, 16, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 33, 34, 37.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2
QS1	BTP	Q, S
D16S539	BTP	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D13S317	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D5S818	BTP	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
D7S820	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
QS2	BTP	Q, S

Per informazioni sulle microvarianti non contenute nel ladder allelico dell'Investigator 24plex, consultare il sito web del National Institute of Standards and Technology (NIST) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti addetti ai servizi tecnici QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni e/o i protocolli presenti in questo manuale, (per informazioni di contatto, visitare il sito support.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

Profili non equilibrati, segnali bassi

- | | |
|---|---|
| a) Volume non corretto di Fast Reaction Mix o di miscela di primer. | Controllare l'impostazione della reazione e ripetere l'amplificazione. |
| b) La miscela master non è stata agitata al vortex prima della distribuzione. | Agitare bene la miscela master al vortex e poi centrifugare brevemente. |

Altezze dei picchi ridotte dei sensori di qualità QS1 e/o QS2 in esperimenti standard

Una leggera dispersione delle altezze dei picchi dei sensori di qualità è normale e non dipende dagli inibitori.

Durante la validazione, l'analista dovrebbe valutare il normale spettro delle variazioni in relazione al tipo di campioni abitualmente analizzati e poi definire una gamma di altezze dei picchi regolare per entrambi i QS. Un calo netto del segnale QS2 al di sotto del 20% del segnale QS1 indica inibizione della reazione della PCR.

Dominanza dei picchi del sensore di qualità

I picchi QS1 e QS2 sono troppo dominanti.

Utilizzando il software GeneMapper ID-X, alla voce "Display Settings" (Impostazioni di visualizzazione) selezionare una nuova impostazione per "all-dye range" (Range tutti i coloranti) per ingrandire la visualizzazione. Il range deve essere compreso tra QS1 e QS2.

Importante: Regolare anche l'individuazione della dimensione [Ranges (range) e Sizing (Dimensionamento)] da 75 a 450 alla voce "Analysis Method Editor" (Modifica metodo di analisi) sotto la "Peak detector" (Rilevatore picchi).

Preparazione dei campioni

L'intensità del segnale del campione deve essere aumentata.

Ridurre il volume del DNA Size Standard 24plex (BTO) ad altezze di picco di circa 500 RFU.

Purificare i prodotti PCR prima di iniziare l'analisi. Si raccomanda il MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN n. cat. 28004 e 28006) per una purificazione rapida ed efficace.

Matrice/calibrazione spettrale non appropriate

Con l'attuale matrice/calibrazione spettrale sono presenti picchi pull-up tra i pannelli dei coloranti (B, G, Y, R, P, O).

Questa matrice non può essere utilizzata per l'analisi. Ripetere la generazione della matrice/la calibrazione spettrale. Accertarsi di seguire scrupolosamente il protocollo corretto per lo strumento d'analisi specifico.

Molti picchi sono etichettati come alleli off-ladder (OL) nei campioni

- a) Il DNA Size Standard 24plex (BTO) non è stato correttamente definito o identificato.
- Fare clic sull'icona arancione "Size Match Editor" (Modifica abbinamento dimensioni) nella barra strumenti superiore del software GeneMapper ID o GeneMapper ID-X. Contrassegnare i frammenti arancioni di tutti i campioni.
- Usare sempre il DNA Size Standard 24plex per gli Investigator Human Identification PCR Kit.
- b) L'intensità dei segnali è troppo alta. Se l'altezza dei picchi dei campioni non è compresa entro la gamma lineare di rilevamento con gli Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer si possono avere maggiori stutter, picchi divisi e artefatti.
- Ridurre la durata d'iniezione in incrementi minimi di 1 s, ridurre la quantità del prodotto di amplificazione PCR per l'analisi, o ridurre la quantità di DNA per PCR.
- c) La presenza di bolle nel capillare causa picchi pull-up in tutti i pannelli cromatici ("picchi") che causano un misnumero allelico.
- Ripetere l'elettroforesi per confermare i risultati. Controllare il numero massimo di iniezioni raccomandate dal produttore dello strumento. Se necessario, impostare una nuova serie di capillari.
- d) Le differenze di prestazioni tra i diversi cicli dei capillari di un analizzatore multicapillare possono causare uno spostamento nell'assegnazione degli alleli.
- Per l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, vanno eseguiti vari cicli di ladder allelici.
- e) Una bassa temperatura ambiente o una bassa temperatura del tampone CE può far spostare i frammenti o causare picchi OL.
- Verificare che le condizioni dell'ambiente siano mantenute come raccomandato dal produttore dello strumento. Accertarsi che i tamponi siano equilibrati per le condizioni dell'ambiente. Si consiglia di preriscaldare lo strumento CE (circa 30 min), come indicato dal produttore.

Iniezione/file del ladder allelico non sono appropriati

- | | |
|--|--|
| a) Si può identificare un segnale addizionale come picco del ladder allelico a causa di disfunzioni durante l'elettroforesi. Se i picchi del ladder allelico sono impropriamente nominati, il ladder non può essere usato per l'analisi. | Usare differenti iniezioni/file del ladder allelico e controllare i dati delle taglie analizzate dalle dimensioni standard (in bp) del ladder allelico.

Usare sempre il DNA Size Standard 24plex per gli Investigator Human Identification PCR Kit. |
| b) Un picco del ladder allelico è al di sotto del valore di rilevamento dei picchi (50–200 RFU) del metodo di analisi usato, quindi non è identificato. | Il ladder allelico deve essere caricato sullo strumento analitico ad una concentrazione superiore a quella dei campioni da analizzare.

In alternativa, i dati del ladder allelico possono essere analizzati con un valore inferiore di rilevamento dei picchi nel software d'analisi. |
| c) Un picco del ladder allelico non è stato identificato perché fuori dal range delle dimensioni (in bp) previsto dal software. | Confrontare la lunghezza dei frammenti (in bp) del primo allele in un colore del ladder allelico con il colore corrispondente nelle categorie. Poi confrontarlo con gli altri alleli. |
| d) Non sono stati trovati alleli punto. | Gli alleli punto sono alleli con differenza di almeno 1 punto rispetto all'allele intero successivo. Controllare le impostazioni del metodo analitico. Ridurre a 11 punti il valore delle dimensioni della finestra picchi. |

Riferimenti

1. Bär, W. et al. (1997). DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Leg. Med.* 110, 175–176.
2. Szibor, R. et al. (2003). Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138, 37–43.

Appendice A: Interpretazione dei risultati

L'analisi post-PCR e l'assegnazione automatica degli alleli con un software d'analisi idoneo garantiscono una distinzione precisa e affidabile degli alleli.

Procedura generale per l'analisi

1. **Controllare le dimensioni standard DNA.**
2. **Controllare il ladder allelico.**
3. **Controllare i controlli positivi e negativi.**
4. **Analizzare e interpretare i dati del campione.**

Picchi pull-up

Possono comparire picchi pull-up se l'altezza dei picchi è fuori del range di rilevamento lineare (vedere "Guida alla risoluzione dei problemi") o se è stata applicata una matrice non corretta. Tali picchi compaiono nella posizione di picchi specifici in altri canali cromatici, di norma con minore intensità di segnale. Per evitare i picchi pull-up, le altezze dei picchi non devono superare le soglie.

Picchi di stutter

Il numero di picchi di stutter dipende dalla sequenza della struttura di ripetizione e dal numero degli alleli. I picchi $n - 4$ sono causati dalla perdita di un'unità di ripetizione durante l'amplificazione dei motivi STR tetranucleotidici, causata dagli effetti di slittamento della Taq DNA polimerasi, I picchi $n - 3$ compaiono soprattutto durante l'amplificazione del motivo STR trinucleotidico D22S1045. Questi picchi vanno interpretati mediante i file modello Investigator per il GeneMapper *ID-X* Software.

Aggiunta di nucleotidi indipendente dal template

A causa della sua attività di transferasi terminale, la *Taq* DNA polimerasi può causare una adenilazione incompleta all'estremità 3' dei frammenti di DNA amplificati. Il picco dell'artefatto è più corto di una base rispetto a quanto previsto (-1 picchi). Tutti i primer inclusi nell'Investigator 24plex QS Kit sono stati progettati per minimizzare questi artefatti. L'altezza dei picchi dell'artefatto si correla alla quantità di DNA. I laboratori dovrebbero definire i propri limiti per l'analisi dei picchi.

Artefatti

La temperatura ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti per PCR usati su strumenti multicapillari, dunque possono verificarsi picchi con spalla o divisi. Se compaiono picchi con spalla o divisi, si consiglia di iniettare nuovamente il campione. Verificare che le condizioni dell'ambiente siano mantenute come raccomandato dal produttore dello strumento. Accertarsi che i tamponi siano equilibrati per le condizioni dell'ambiente.

Appendice B: variazione dei volumi di PCR quando si utilizza l'Investigator 24plex QS Kit

L'Investigator 24plex QS Kit può essere usato con volumi di miscele per metà reazione (Fast Reaction Mix + miscela di primer). Si noti che, pur avendo testato con successo il volume a reazione ridotta qui descritto, i migliori tassi complessivi di successo possono essere comunque ottenuti usando i volumi per reazione intera, come raccomandato nel manuale del kit.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Investigator 24plex QS Kit (100)	Miscela di primer, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO) e acqua priva di nucleasi	382415
Investigator 24plex QS Kit (400)	Miscela di primer, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO) e acqua priva di nucleasi	382417
Prodotti correlati		
Matrix Standard BT6 (50)	Standard matrice per 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO, per strumenti Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers	386224
Investigator Human Identification PCR Kit		
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Da usare su sistemi Applied Biosystems 7500 Real-Time: Quantiplex Pro Reaction Mix, Quantiplex Pro Primer Mix, Quantiplex Pro Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387216

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Da usare sui QIAGEN Rotor-Gene Q Real-Time Systems: Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix, Quantiplex Pro RGQ Primer Mix, Male Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316
Investigator 24plex GO! Kit (200)*	Miscela di primer, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO)	382426

* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori; si prega di informarsi.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e sulle clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R7 11/2018	Appendice B aggiunta
R8 12/2020	Aggiunta estensione finale facoltativa. Aggiornata la sezione "Informazioni per gli ordini".
R9 02/2021	La Tabella 3 è suddivisa nelle Tabelle 3a e 3b. Aggiunti "Veriti™ 96-Well Thermal Cycler" e "ProFlex™ 96-well PCR System" nella sezione "Attrezzature e reagenti forniti dall'operatore".

Note

Contratto di concessione in licenza limitata del Investigator 24plex Kit

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

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

Marchi commerciali: QIAGEN[®], QIAamplifier[®], Investigator[®], MinElute[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); Bio-Rad[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf[®], Mastercycler[®] (Eppendorf AG); 3500[™], Applied Biosystems[®], 6-FAM[™], GeneAmp[®], GeneMapper[®], Hi-Di[™], POP-4[®], ProFlex[™], Veriti[™] (Thermo Fisher Scientific o sue controllate); GenBank[®] (US Department of Health and Human Services). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

02/2021 HB-1860-009 © 2021 QIAGEN. Tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com