

Agosto 2012

Manual del kit Investigator[®] Quantiplex HYres

Para la cuantificación de ADN humano y
masculino en muestras forenses



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas.
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas.
- Investigación con microARN y ARNi.
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular.

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite www.qiagen.com.

Índice

Contenido del kit	4
Almacenamiento	4
Uso previsto	4
Información de seguridad	5
Control de calidad	5
Introducción	6
Principio y procedimiento	6
Descripción de los protocolos	11
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	11
Notas importantes	12
Selección de kits y protocolos	12
Riesgos de contaminación	12
Controles	13
Protocolos	
■ Cuantificación de ADN con el RotorGene Q	14
■ Cuantificación de ADN con Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification	38
■ Cuantificación de ADN con los sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR	53
Interpretación de los resultados	67
Guía de resolución de problemas	70
Bibliografía	74
Información para pedidos	75

Contenido del kit

Investigador Quantiplex HYres Kit	(200)
Nº de referencia	387116
Número de reacciones de 20 µl	200
Reaction Mix FQ (mezcla de reacción FQ)	2 x 1,15 ml
Primer Mix IC YQ (mezcla de cebador IC YQ)	1 x 1,8 ml
Control DNA Z1 (ADN de control Z1) (20 ng/µl)	0,2 ml
QuantiTect® Nucleic Acid Dilution Buffer (tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect)	1 vial
Quick-Start Protocol (protocolo de inicio rápido) (inglés)	1

Almacenamiento

Conserve la mezcla de reacción FQ, la mezcla de cebador IC YQ y el ADN de control Z1 a entre +2 y +8°C. No congele estos componentes del kit.

Conserve el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect a -20 °C. Evite la congelación y la descongelación repetidas.

La mezcla de cebador IC YQ debe almacenarse protegida de la luz.

Las muestras de ADN deben almacenarse separadas de los reactivos de PCR.

Bajo estas condiciones, los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Uso previsto

El kit Investigador Quantiplex HYres está concebido para aplicaciones de biología molecular en pruebas forenses, de identificación humana y de paternidad. Este producto no está concebido para el diagnóstico, la prevención ni el tratamiento de enfermedades.

Durante la manipulación de los productos se debe tener el debido cuidado y prestar la atención necesaria. Recomendamos a los usuarios de los productos QIAGEN que sigan las directrices de los NIH (Institutos Nacionales de Salud estadounidenses) para los experimentos con ADN recombinante u otras directrices pertinentes.

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para más información, consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales (material safety data sheets, MSDS) correspondientes. Dichas hojas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx, donde podrá encontrar, ver e imprimir la hoja de datos sobre seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit QIAGEN.

Información para emergencias disponible las 24 horas

Información médica para emergencias disponible en inglés, francés y alemán las 24 horas del día en:

Centro de Información de Toxicología, Maguncia, Alemania.

Tfno: +49-6131-19240

Control de calidad

Conforme al sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de kits Investigator Quantiplex HYres se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Introducción

La identificación humana se basa normalmente en el análisis de repeticiones cortas en tándem (STR), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o polimorfismos inserción/delección (DIP), dependiendo de las exigencias del examen o de la calidad de la muestra. Estos ensayos múltiplex empleados para la identificación humana son sistemas complejos que requieren una serie determinada de datos de entrada por medio de plantillas.

La línea de productos Investigator Quantiplex consiste en el kit Investigator Quantiplex, concebido para la cuantificación de ADN genómico humano total, y el kit Investigator Quantiplex HYres, diseñado para la cuantificación de ADN genómico humano y masculino en una muestra mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Ambos kits están diseñados para confirmar si una muestra contiene suficiente ADN para permitir el análisis de huellas genéticas (como el análisis de STR, DIP o SNP). Además, los kits pueden contribuir a determinar si una muestra contiene inhibidores que puedan interferir con tales aplicaciones, requiriendo en ese caso la purificación en mayor grado de la muestra.

Principio y procedimiento

El kit Investigator Quantiplex HYres es un sistema listo para su uso en la detección de ADN humano y masculino mediante PCR cuantitativa en tiempo real. El kit permite una cuantificación rápida y precisa de ADN humano en muestras forenses de bases de datos y de casos específicos. El ensayo ofrece una sensibilidad de hasta $< 1 \text{ pg}/\mu\text{l}$, con una precisa cuantificación por debajo de $4,9 \text{ pg}/\mu\text{l}$, donde la curva estándar muestra linealidad.

El kit contiene reactivos y una ADN-polimerasa para la amplificación específica de 4NS1C[®], una región con 146 bp presente en varios autosomas del genoma humano (patente en trámite), y para la detección de productos específicos de la PCR en el ciclador de PCR en tiempo real Rotor-Gene[®] Q o en los sistemas Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR. La región diana para la cuantificación humana se seleccionó con el fin de proporcionar una alta sensibilidad con una elevada fiabilidad en diferentes individuos y poblaciones. La región diana se validó en un estudio externo llevado a cabo por varios laboratorios forenses, que analizaron la conservación de su número de copias en la población humana. Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real para comparar una copia única específica humana y la diana multicopia del Investigator Quantiplex HYres. El ΔC_T para las dos dianas resultó comparable en poblaciones diferentes y entre muestras de ADN masculino y femenino, demostrándose la conservación del número de copias diana en grupos de diferentes etnias y géneros. La región diana para la cuantificación humana se detecta mediante el canal verde del Rotor-Gene Q o el canal de colorante FAM[™] de los instrumentos Applied Biosystems.

La región diana para la cuantificación de ADN masculino se seleccionó con el fin de proporcionar una alta sensibilidad con una elevada fiabilidad en diferentes individuos y poblaciones y en presencia de muestras de ADN mezcladas. Esta región diana también fue validada en un estudio externo por una serie de laboratorios forenses, donde se analizó la conservación de su número de copias en la población humana. Una vez más se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real para comparar una copia única específica humana y la diana multicopia masculina del Investigator Quantiplex HYres. El ΔC_T para las dos dianas resultó comparable en poblaciones diferentes y no se detectó señal para muestras de ADN femenino, demostrándose la conservación del número de copias diana en grupos de diferentes etnias y la especificidad del cromosoma Y. La región diana para la cuantificación masculina se detecta como un fragmento de 129 bp mediante el canal rojo del Rotor-Gene Q o el canal de colorante Cy5™ de los instrumentos Applied Biosystems.

Además, el kit Investigator Quantiplex HYres contiene un equilibrado control de amplificación interna que sirve para comprobar el éxito de la amplificación e identificar la presencia de inhibidores de la PCR. Este sistema de amplificación heterógena se detecta como un control interno (IC) de 200 bp en el canal amarillo del Rotor-Gene Q o en el canal de colorante VIC® de los instrumentos Applied Biosystems.

La detección de la amplificación se lleva a cabo mediante cebadores Scorpions® y rápidos e innovadores productos químicos para la PCR. Los cebadores Scorpions son moléculas bifuncionales que contienen un cebador para la PCR unido de forma covalente a una sonda (Figura 1). El fluoróforo de esta sonda interacciona con un supresor de señal, también presente en la sonda, que reduce la fluorescencia. Durante la PCR, cuando la sonda se une a los productos de la PCR, el fluoróforo y el supresor de señal se separan, lo que provoca un aumento de la fluorescencia en el tubo de reacción.

Los cebadores Scorpions se caracterizan por su rápida hibridación con la secuencia diana a través de una reacción intramolecular (Whitcombe, 1999). Los productos químicos de la reacción se optimizaron cuidadosamente para potenciar en mayor grado el rápido mecanismo de acción.

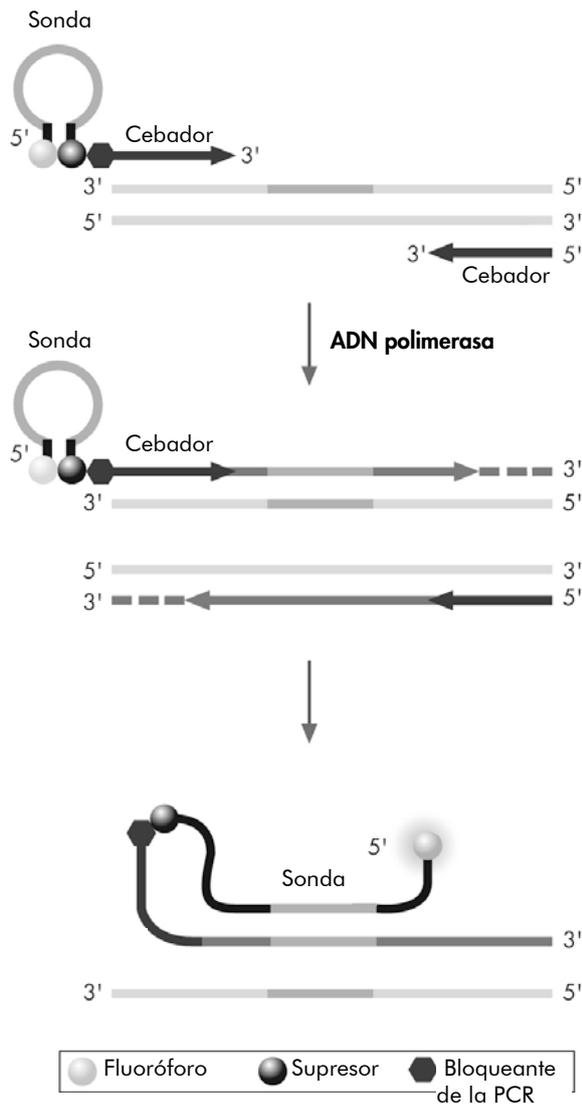


Figura 1. Cebadores Scorpions y su función.

Control interno

El control interno (IC) se amplifica y se detecta en el canal amarillo del Rotor-Gene Q o en el canal de colorante VIC de los instrumentos Applied Biosystems. El fluoróforo puede detectarse con la calibración ya existente del VIC. El IC está diseñado para resultar más sensible a inhibidores que las dianas para la cuantificación humana y masculina. La comparación de los valores C_T del sistema de IC para estándares de ADN con los valores C_T del sistema de IC para muestras desconocidas puede indicar la inhibición potencial de la reacción en las muestras desconocidas. Por tanto, incluso si el sistema de IC informa de la presencia de inhibidores en la muestra, la cuantificación de ADN proporcionará generalmente un resultado fiable. No obstante, la presencia de inhibidores en la muestra puede afectar a la aplicación posterior, por lo que debe tenerse en cuenta.

La amplificación positiva del sistema de IC generará un valor C_T de aproximadamente 31.* Cabe esperar una variación de ± 1 en los valores C_T del sistema de IC para las muestras de la curva estándar. El uso de grandes cantidades de ADN humano (> 150 ng/reacción) puede dar un valor C_T más alto para el sistema de IC.

Debe realizarse una validación de laboratorio con inhibidores relevantes para determinar los criterios de detección de la inhibición.

Mezcla de reacción FQ

La mezcla de reacción FQ contiene una ADN-polimerasa formulada de forma exclusiva y tampón de reacción. Los innovadores productos químicos y la enzima para la PCR, desarrollados específicamente para la identificación humana, permiten obtener una alta sensibilidad y velocidad. La mezcla nuevamente formulada de enzima y tampón de reacción es especialmente adecuada para facilitar la rápida reacción del cebador Scorpions.

Además, el tampón especialmente desarrollado para la PCR contiene el aditivo Q-Bond[®], que permite tiempos cortos de ciclado en cicladores estándar y en cicladores rápidos con rápidas velocidades de incremento. El Q-Bond aumenta la afinidad de la ADN-polimerasa para segmentos cortos de ADN monocatenario, reduciendo a unos segundos el tiempo necesario para el *annealing* cebador/sonda. Además, la composición única del tampón potencia la disociación del ADN, permitiendo tiempos cortos de desnaturalización y de *annealing*/extensión.

La mezcla de reacción FQ se basa también en el exclusivo sistema de tampón para la PCR de QIAGEN. El tampón contiene una combinación equilibrada de KCl y NH_4Cl , lo que favorece una alta proporción de unión de cebadores de específica a no específica durante el paso de *annealing* de cada ciclo de PCR. Esto crea unas rigurosas condiciones de *annealing* que resultan en una mayor especificidad de la PCR.

* Este valor puede variar en función del instrumento que se utilice.

ADN de control y curva estándar

Los estándares de cuantificación de ADN son esenciales para realizar un análisis preciso. Recomendamos encarecidamente las series de diluciones 1:4 con 7 puntos de concentración en la curva estándar para cada ensayo. El ADN de control Z1 contiene una mezcla de ADN masculino y femenino que imita el caso de una muestra mezclada — 1 μ l de ADN de control Z1 contiene 20 ng de ADN humano, que incluye 6,66 ng de ADN masculino. Para garantizar la exactitud en el pipeteado, el volumen mínimo de entrada de ADN para diluciones debe ser de 10 μ l. La curva estándar está diseñada para ser fácilmente configurada mediante una serie adecuada de dilución 1:4. Si se utiliza el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect para diluir el ADN de control Z1, las diluciones se mantienen estables durante al menos 1 semana a temperaturas entre los +2 y los +8 °C.

Importante: el ADN de control Z1 está optimizado únicamente para su uso con kits Investigator Quantiplex.

Plantillas para el trabajo de rutina

Con el fin de agilizar la configuración de los instrumentos y el análisis de los resultados obtenidos con el Rotor-Gene Q, el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR for Human Identification y los sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR, QIAGEN ha desarrollado un juego de archivos de plantilla (Tabla 1). Estas plantillas pueden descargarse desde la pestaña “Resources” (recursos) en www.qiagen.com/QuantiplexHYres.

Tabla 1. Archivos de plantilla disponibles para Rotor-Gene Q

Archivo de plantilla	Objetivo
Investigator Quantiplex HYres Kit Cycling (ciclado del kit Investigator Quantiplex HYres)	Preajuste del protocolo de ciclado
Investigator Quantiplex HYres Kit Sample (muestra del kit Investigator Quantiplex HYres)	Nombre y tipo de la muestra y concentración para las curvas estándar y el control interno
Investigator Quantiplex HYres Kit Analysis Settings for the Yellow Channel (configuración de análisis del kit Investigator Quantiplex HYres para el canal amarillo)	Configuración de los valores C_T

Descripción de los protocolos

Este manual contiene protocolos para 4 cicladores diferentes.

- Rotor-Gene Q
- Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification
- Sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para más información, consulte las correspondientes fichas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) que el proveedor del producto pone a su disposición.

- Pipetas y puntas de pipeta
- Consumibles libres de nucleasas (libres de ARNasa/ADNasa): se debe prestar especial atención a evitar la contaminación con nucleasas de todos los reactivos y consumibles empleados en la preparación de la PCR para la detección sensible de ADN humano
- Dispositivo de enfriamiento o hielo
- Termociclador en tiempo real (Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification o sistemas Applied Biosystems 7500 o 7500 Fast Real-Time PCR)
- Placas o tubos de PCR (utilice las placas o los tubos de PCR de paredes finas recomendados por el fabricante del termociclador que utilice)
- Para el Rotor-Gene Q: se recomiendan los Strip Tubes and Caps (tubos en tira y tapones), 0,1 ml (n° ref. 981103 o 981106). También pueden utilizarse los PCR Tubes (tubos para PCR), 0,2 ml (n° ref. 981005 o 981008), los Rotor-Disc 72 (discos Rotor-Disc 72) (n° ref. 981301 o 981303), y los Rotor-Disc 100 (discos Rotor-Disc 100).

Notas importantes

Selección de kits y protocolos

Este manual contiene protocolos y recomendaciones para la cuantificación de ADN con los instrumentos que se enumeran en la Table 2. QIAGEN no ha validado otros cicladores en tiempo real distintos a los mencionados para la cuantificación de ADN con el kit Investigator Quantiplex HYres.

Nota: también es posible la configuración automatizada de la reacción. Los protocolos Q validados para QIAgility® están disponibles sin costes adicionales en la pestaña "User Support" (asistencia al usuario) en <http://www.qiagen.com/products/QIAgility.aspx>.

Tabla 2. Protocolos para el kit Investigator Quantiplex HYres con diferentes termocicladores en tiempo real

Termociclador en tiempo real	Protocolo
Rotor-Gene Q	Página 14
Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification	Página 53
Sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR	Página 38

Riesgos de contaminación

No retire el sello de las placas de reacción una vez que la amplificación haya terminado. La retirada del sello de la placa aumenta el riesgo de contaminación de reacciones posteriores con el producto amplificado.

Todas las mezclas de reacción deben prepararse en un área diferente a la empleada para el aislamiento del ADN y el análisis del producto de la PCR para minimizar el riesgo de contaminación cruzada. Utilice además puntas desechables con filtros hidrofóbicos para minimizar la contaminación cruzada.

Controles

Control sin plantilla (NTC)

Deben incluirse réplicas de reacciones NTC en cada ciclo de cuantificación con el fin de detectar contaminaciones. Los NTC deben contener todos los componentes de la reacción excepto la plantilla. La cuantificación con el kit Investigator Quantiplex HYres es extremadamente sensible, por lo que es muy importante evitar la contaminación en el pipeteado del NTC.

Recomendamos llevar a cabo las reacciones NTC al menos por duplicado.

Control positivo interno

Para comprobar el éxito de la amplificación y la presencia de inhibidores de la PCR, se emplea un control positivo interno (detectado mediante un segundo cebador Scorpions con una etiqueta diferente). El cebador, el cebador Scorpions y la plantilla para el control interno forman parte de la mezcla de cebador IC YQ.

Protocolo: cuantificación de ADN con el RotorGene Q

Este protocolo está optimizado para el uso del kit Investigator Quantiplex HYres en el Rotor-Gene Q.

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 la PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrofóbicos para minimizar la contaminación cruzada.
- Adopte las condiciones de ciclado especificadas en el protocolo. El ciclado está optimizado para este ensayo.
- Utilice el volumen de plantilla especificado en el protocolo. La reacción está optimizada para su uso con 2 μ l de ADN de plantilla. No utilice más o menos de 2 μ l por cada reacción de 20 μ l.
- Recomendamos utilizar un rotor de 72 pocillos.
- Las diluciones de estándares de cuantificación de ADN en el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect pueden conservarse a 4 °C durante al menos 1 semana.
- La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Cosas que hacer antes de empezar

- Descargue los archivos de plantilla "Investigator Quantiplex HYres Kit Cycling file", "Investigator Quantiplex HYres Kit Sample file" e "Investigator Quantiplex HYres Kit Analysis Settings for the Yellow Channel file" desde la pestaña 'Resources' en www.qiagen.com/QuantiplexHYres/.

Procedimiento

1. Descongele el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

2. Prepare diluciones en serie frescas del ADN de control Z1 conforme a la Table 3. Mezcle mediante agitación vorticial durante al menos 5 segundos y centrifugue cada dilución brevemente antes de tomar una cantidad alícuota para la próxima dilución. Utilice una nueva punta de pipeta para cada dilución.

Tome precauciones para evitar la contaminación cruzada.

Vea la tabla 7 para obtener información más completa sobre la concentración para las diluciones de la curva estándar.

Tabla 3. Diluciones en serie del ADN de control Z1

Dilución en serie del ADN de control Z1	ADN de control Z1	Tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect
20 ng/ μ l	ADN no diluido	–
5 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
1,25 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,3125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,078125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,01953125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,0048828125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l

3. Descongele los ácidos nucleicos de plantilla. Mezcle la mezcla de reacción FQ y la mezcla de cebador IC YQ invirtiendo los tubos varias veces.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

4. Prepare una mezcla maestra conforme a la Table 4.

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

Prepare un volumen de mezcla maestra 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.

La preparación de la reacción se puede realizar normalmente a temperatura ambiente (15–25 °C). No obstante, recomendamos mantener los reactivos, las muestras y los controles en hielo o en un dispositivo de enfriamiento.

Tabla 4. Mezcla maestra para la cuantificación de ADN

Componente	Volumen por reacción de 20 μl	Concentración final
Mezcla de reacción FQ	9 μ l	1x
Mezcla de cebador IC YQ	9 μ l	1x
Volumen total de mezcla maestra	18 μl	

5. Mezcle la mezcla maestra meticulosamente y vierta 18 μ l en tubos para Rotor-Gene Q o en el disco Rotor-Disc.

6. Añada 2 μ l de tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect a los tubos de NTC.

Asegúrese de que los tubos de NTC no entran en contacto con ADN humano.

7. Añada 2 μ l de diluciones de ADN de control o 2 μ l de ADN de muestra desconocida a los tubos individuales de PCR y mezcle meticulosamente.

Mezcle cuidadosamente para evitar las concentraciones localizadas de sal y de ADN.

La Table 5 muestra una posible configuración de placa. Asegúrese de que la mezcla maestra y la plantilla están mezcladas meticulosamente. Es necesario realizar ciclos por duplicado de las diluciones del ADN de control para cada ensayo y en cada placa de reacción.

Tabla 5. Posible configuración de placa para reacciones en el Rotor-Gene Q con tubos de tira (Strip Tubes).

Contenido de los pocillos															
1	20	9	0,0781	17	DESC	25	DESC	33	DESC	41	DESC	49	DESC	57	DESC
2	20	10	0,0781	18	DESC	26	DESC	34	DESC	42	DESC	50	DESC	58	DESC
3	5	11	0,0195	19	DESC	27	DESC	35	DESC	43	DESC	51	DESC	59	DESC
4	5	12	0,0195	20	DESC	28	DESC	36	DESC	44	DESC	52	DESC	60	DESC
5	1,25	13	0,0049	21	DESC	29	DESC	37	DESC	45	DESC	53	DESC	61	DESC
6	1,25	14	0,0049	22	DESC	30	DESC	38	DESC	46	DESC	54	DESC	62	DESC
7	0,3125	15	NTC	23	DESC	31	DESC	39	DESC	47	DESC	55	DESC	63	DESC
8	0,3125	16	NTC	24	DESC	32	DESC	40	DESC	48	DESC	56	DESC	64	DESC

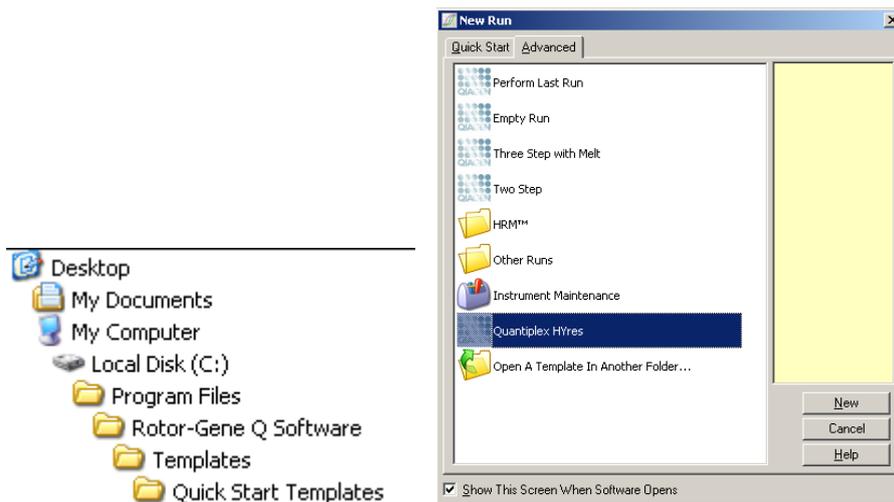
Todas las cantidades están expresadas en ng/ μ l. DESC: muestra desconocida.

8. Cierre los tubos de PCR, colóquelos en el rotor adecuado en el ciclador Rotor-Gene Q y acople el anillo de bloqueo.

Si está utilizando tubos, las posiciones vacías en el rotor deberán llenarse con tubos de PCR vacíos.

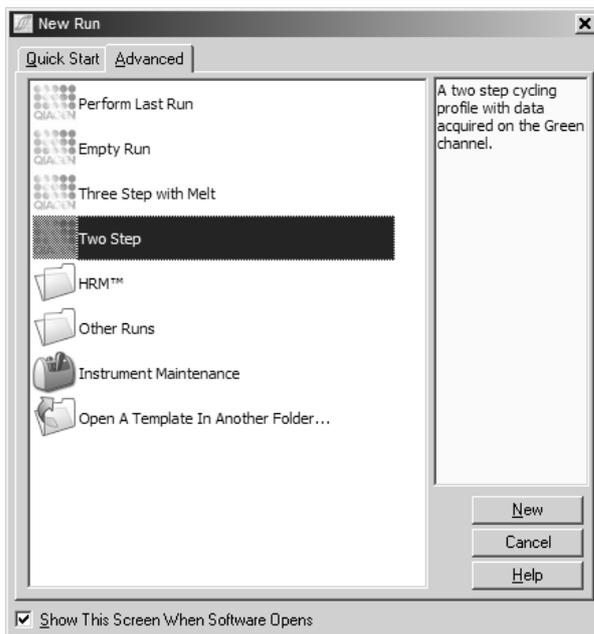
9. Abra el software Rotor-Gene. Recomendamos utilizar el archivo de plantilla suministrado. En el Advanced Wizard (asistente avanzado), seleccione "Open A Template In Another Folder..." (abrir una plantilla en otra carpeta) y cargue el archivo "Investigator Quantiplex HYres Kit Cycling file".

Si copia el archivo de plantilla "Investigator Quantiplex HYres Kit Cycling file" en las Rotor-Gene Q Templates (plantillas de Rotor-Gene) y en las Quick Start Templates (plantillas de inicio rápido), la plantilla aparecerá directamente en las ventanas Quick Start (inicio rápido) y Advanced Wizard.



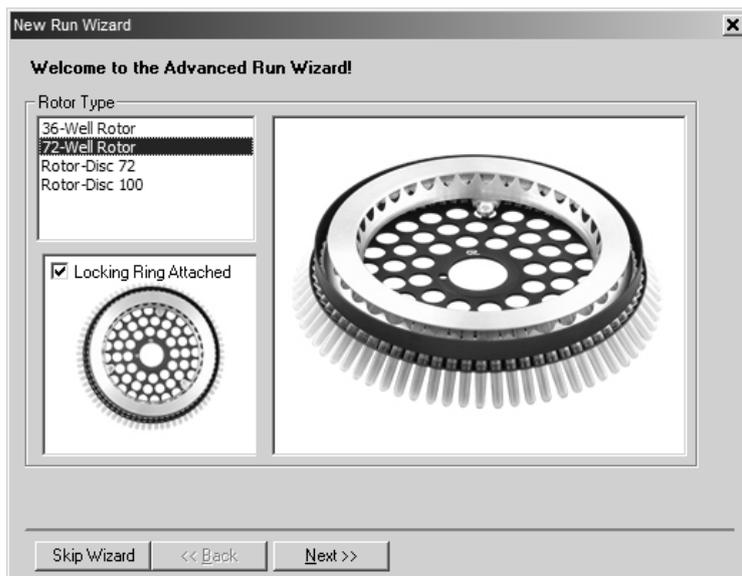
10. Para configurar el ciclado manualmente, seleccione el perfil de ciclado "Two Step" (dos pasos) y haga clic en "New" (nuevo).

Recomendamos utilizar el archivo de plantilla suministrado (consulte la página 13 para obtener información relativa a la descarga) para facilitar la preparación de la reacción. Cuando utilice archivos de plantilla, los ajustes puede ser ya los descritos en el siguiente paso. En tal caso, proceda a la pantalla siguiente.



Advanced Wizard del software Rotor-Gene.

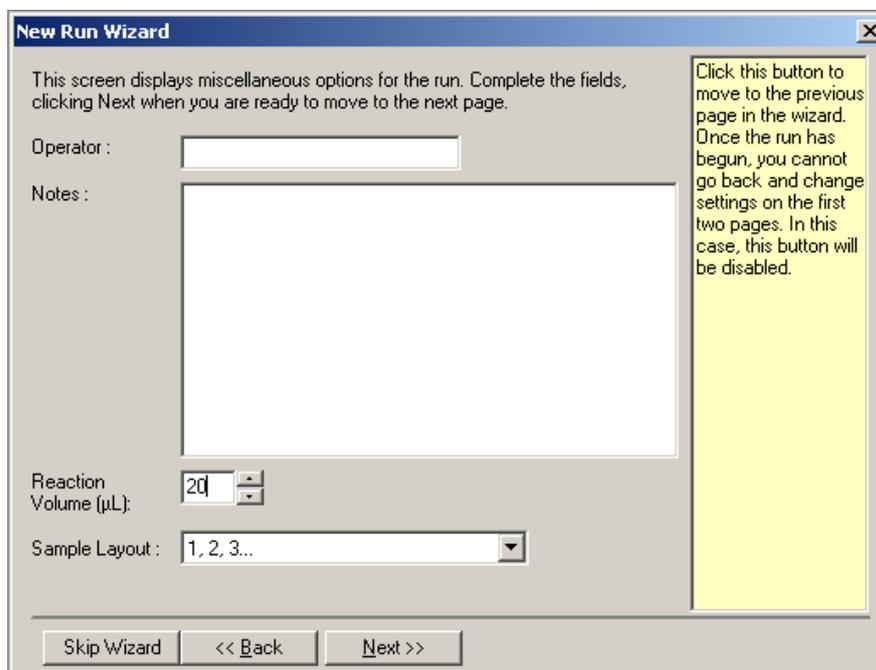
11. Seleccione el rotor correcto y confirme que el anillo de bloqueo está acoplado marcando la casilla. Haga clic en "Next" (Siguiente) para continuar.



Confirmación de que el anillo de bloqueo está acoplado.

12. Asegúrese de que el volumen de la reacción es 20 μ l y de que la casilla "Apply Ambient Air Correction" (aplicar corrección de aire ambiente) está marcada. Haga clic en "Next" para continuar.

Nota: la función Apply Ambient Air Correction no está disponible en todas las versiones del software. Si no aparece en su software, simplemente haga clic en "Next" para continuar.



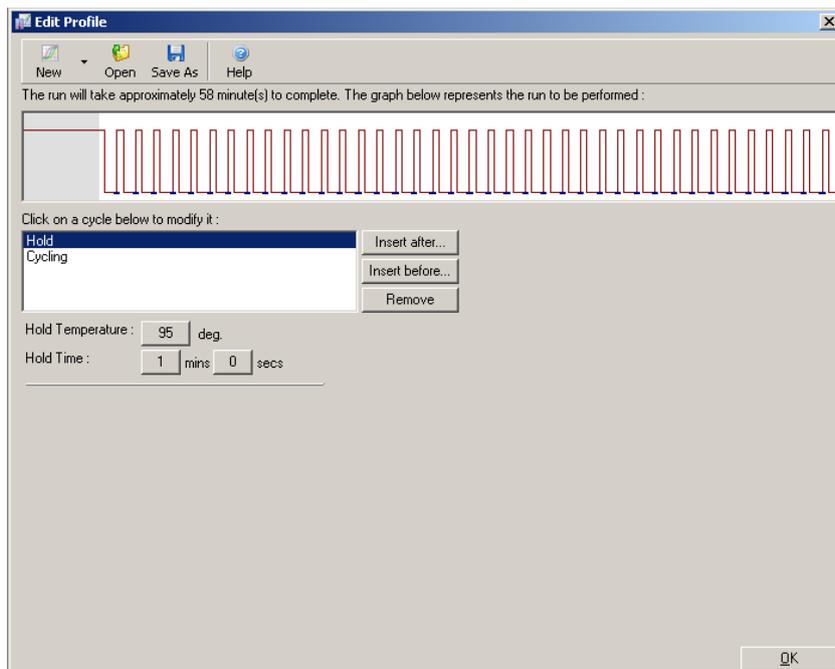
Introducción del volumen de reacción.

13. Haga clic en “Edit Profile” (editar perfil) y programe el Rotor-Gene Q conforme a la Table 6. Vea también las figuras en las páginas 20 y 21.

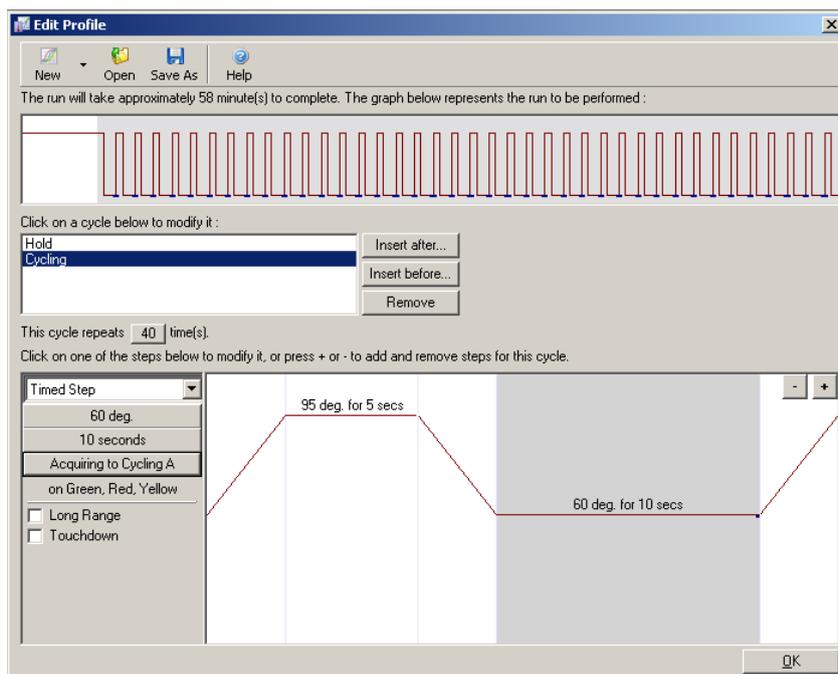
La adquisición de datos debe realizarse durante el paso de *annealing*/extensión combinada.

Tabla 6. Condiciones de ciclado para el Rotor-Gene Q

Paso	Temp	Tiempo	Número de ciclos	Comentarios adicionales
Paso inicial de activación de la PCR	95 °C	1 min	–	La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C para activar la ADN polimerasa
Ciclado de dos pasos:				
desnaturalización	95 °C	5 s	40 ciclos	
<i>annealing</i> /extensión combinada	60 °C	10 s		Realice la recogida de datos de fluorescencia utilizando los canales verde, rojo y amarillo con optimización de ganancia automática



Paso inicial de activación de la PCR. La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C durante 1 minuto para activar la ADN polimerasa.



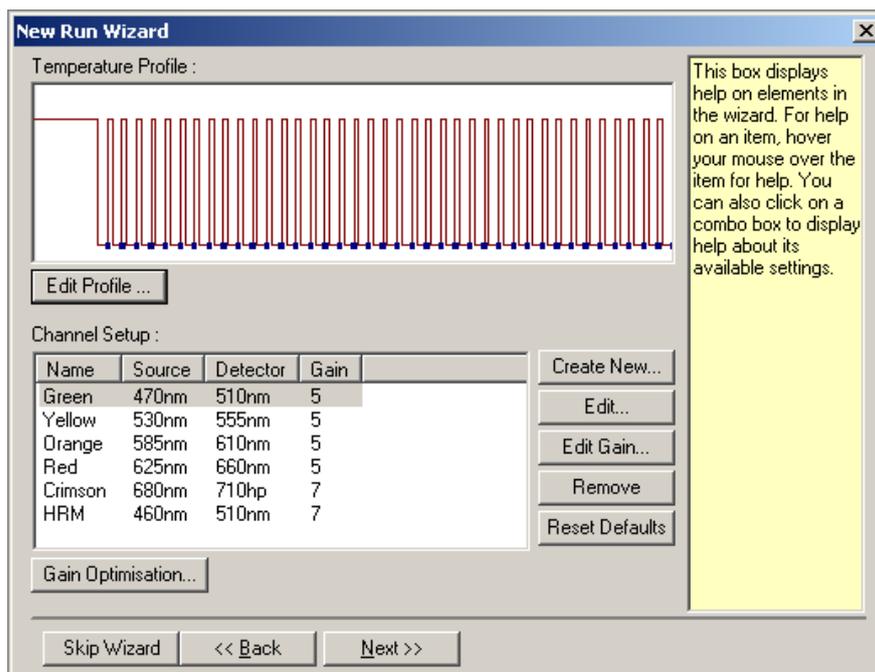
Ciclado de dos pasos. La PCR requiere 40 ciclos. Cada ciclo comprende 2 pasos: a 95 °C durante 5 s (paso de desnaturalización) y a 60 °C durante 10 s (paso de *annealing*/extensión).

14. Haga clic en OK para cerrar la ventana y volver al Wizard (asistente).

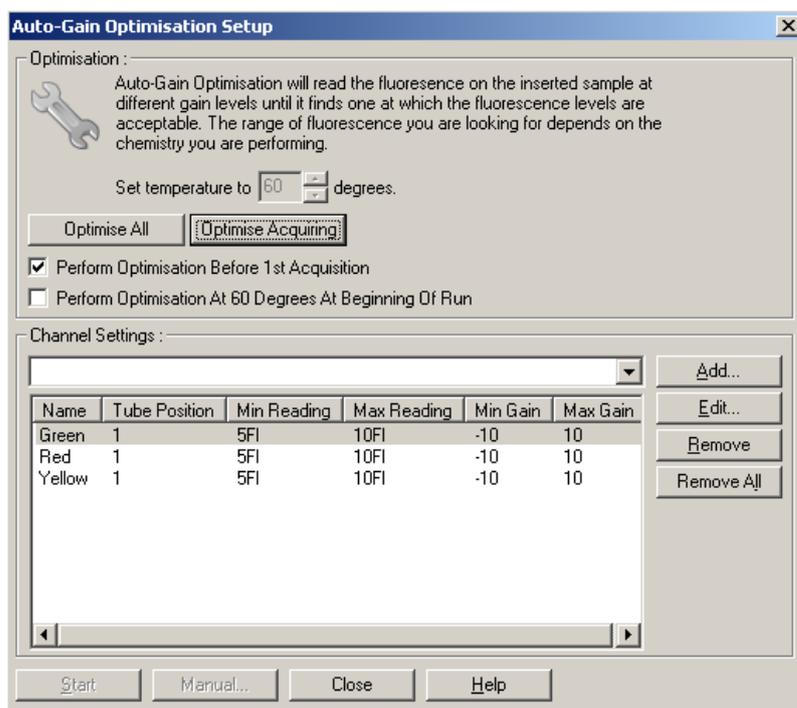
15. Para establecer la configuración de optimización de ganancia para los canales verde, amarillo y rojo, haga clic en "Gain Optimisation" (optimización de ganancia), seguido de "Optimise Acquiring" (optimizar adquisición). En el cuadro de diálogo que se abre, confirme la configuración estándar para los tres canales. A continuación haga clic en "OK".

16. Marque la casilla "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (realizar la optimización antes de la 1ª adquisición) y haga clic en "Close" (cerrar).

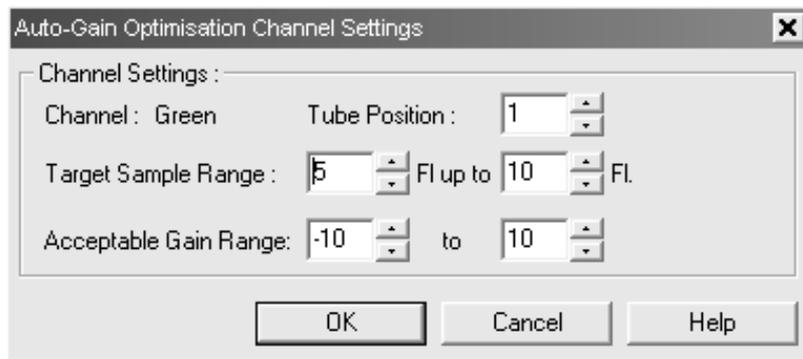
Asegúrese de que el tubo en la posición 1 no está vacío, ya que la optimización de ganancia se realizará en este tubo.



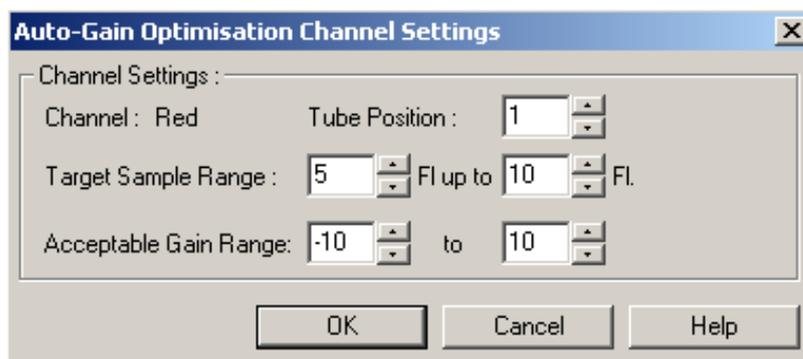
Optimización de ganancia.



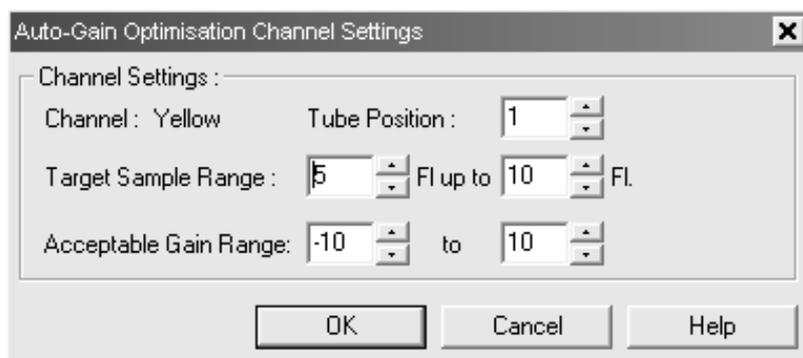
Optimizar adquisición.



Confirmación de la configuración de la optimización de ganancia para el canal verde.

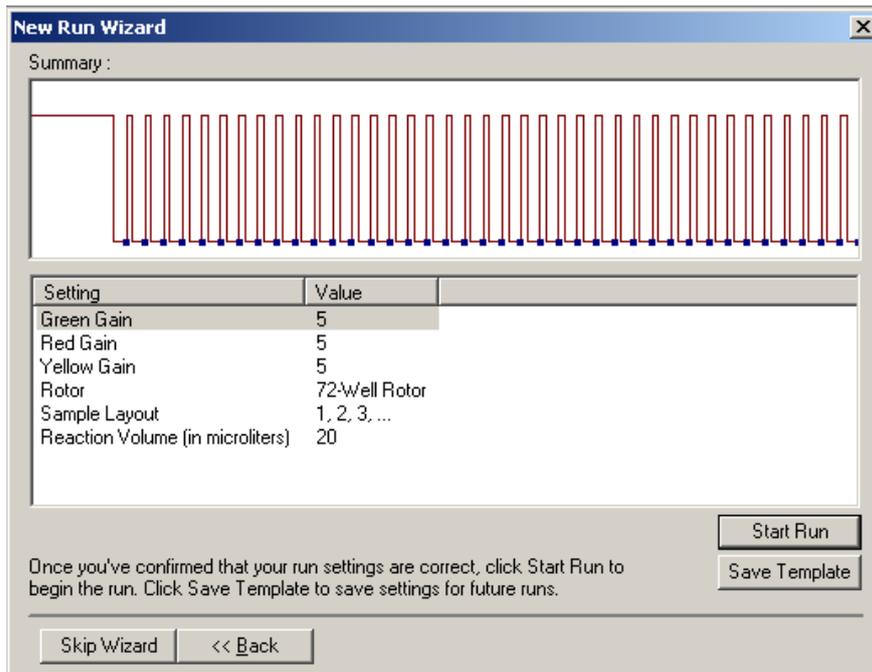


Confirmación de la configuración de la optimización de ganancia para el canal rojo.



Confirmación de la configuración de la optimización de ganancia para el canal amarillo.

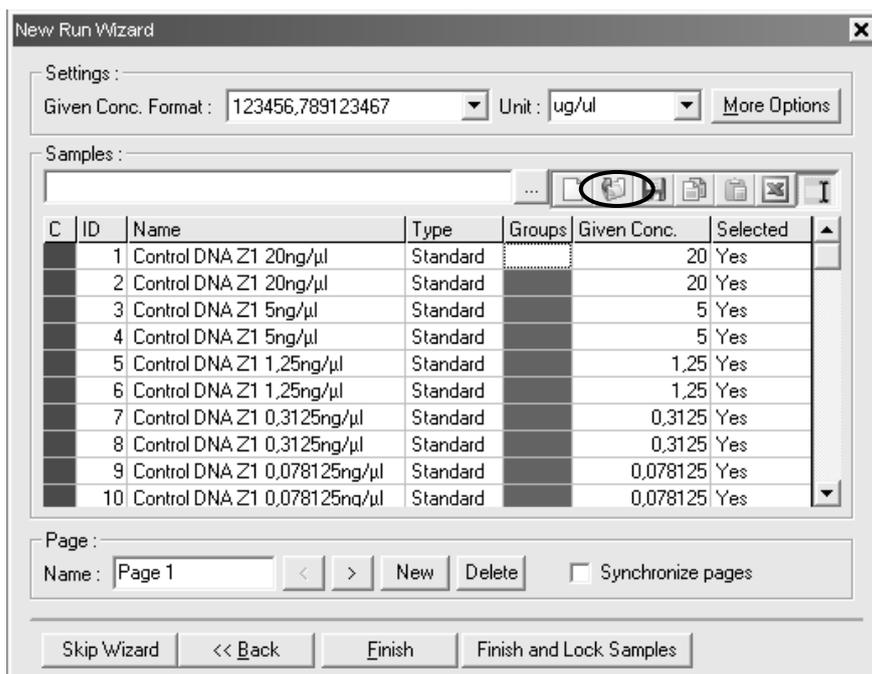
- 17. Haga clic en "Next" para confirmar el perfil de temperatura y la configuración del canal y compruebe que todos los parámetros son correctos.**



Resumen de parámetros.

18. Inicie el ciclador Rotor-Gene haciendo clic en "Start run" (iniciar ciclo). Se le instará a introducir un nombre de archivo y a guardar el archivo del ciclo.
19. Una vez que el ciclo haya comenzado, puede introducir un nombre y una descripción para cada reacción mientras espera a que el ciclo termine.

Si utiliza la configuración de placa recomendada en la Tabla 5, puede utilizar también el "Investigator Quantiplex HYres Kit Sample file". Consulte la página 13 para obtener información relativa a descargas. Para cargar el archivo de plantilla, vaya a "Open" (abrir) y seleccione el archivo de plantilla necesario. A continuación se muestra un ejemplo de archivo de plantilla.



Archivo de plantilla para editar la curva estándar.

Análisis de datos

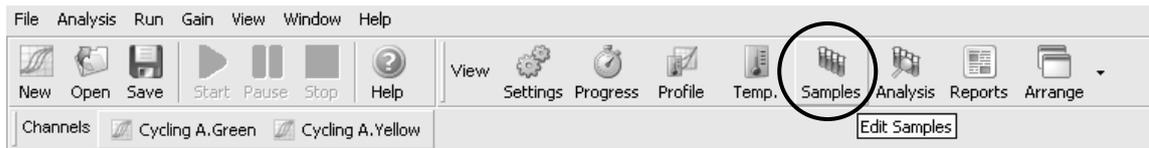
La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste siempre la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Procedimiento

- 1. Abra el archivo del ciclo utilizando el software Rotor-Gene Q. Vaya a "File" (archivo), después a "Open" y a "Browse" (examinar) para localizar el archivo guardado.**
- 2. Antes de crear una curva estándar es necesario definir los estándares. Si los estándares ya fueron definidos antes de iniciar el ciclo, siga con el paso 13.**

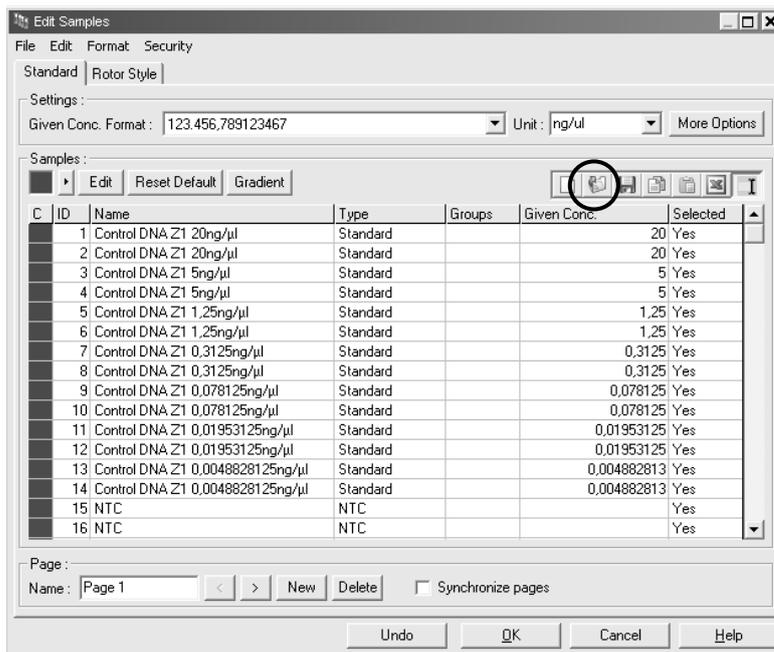
Si utiliza la configuración de placa recomendada en la Table 5, también puede importar directamente el nombre y el tipo de muestra, así como la concentración de los estándares, mediante el "Investigator Quantiplex HYres Kit Sample file". Recomendamos el uso de dicho archivo para agilizar la configuración de la reacción. Consulte la página 13 para obtener información relativa a descargas.

- 3. Seleccione la herramienta Edit Sample (editar muestras) haciendo clic en "Samples" (muestras).**



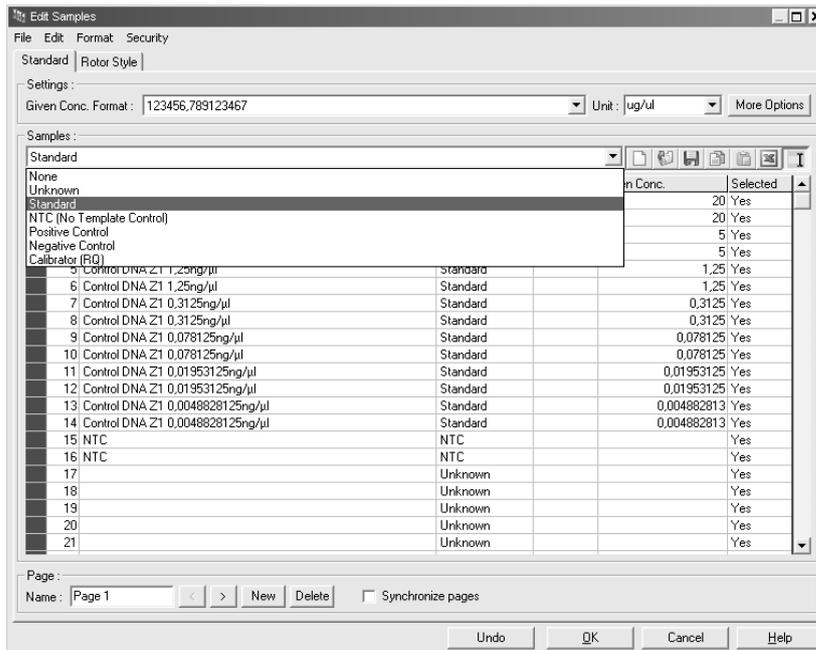
Herramienta Edit Sample en el software Rotor-Gene Q.

4. El "Investigator Quantiplex HYres Kit Sample file" puede cargarse yendo a "Open" y escogiendo el archivo. Continúe en el paso 14.



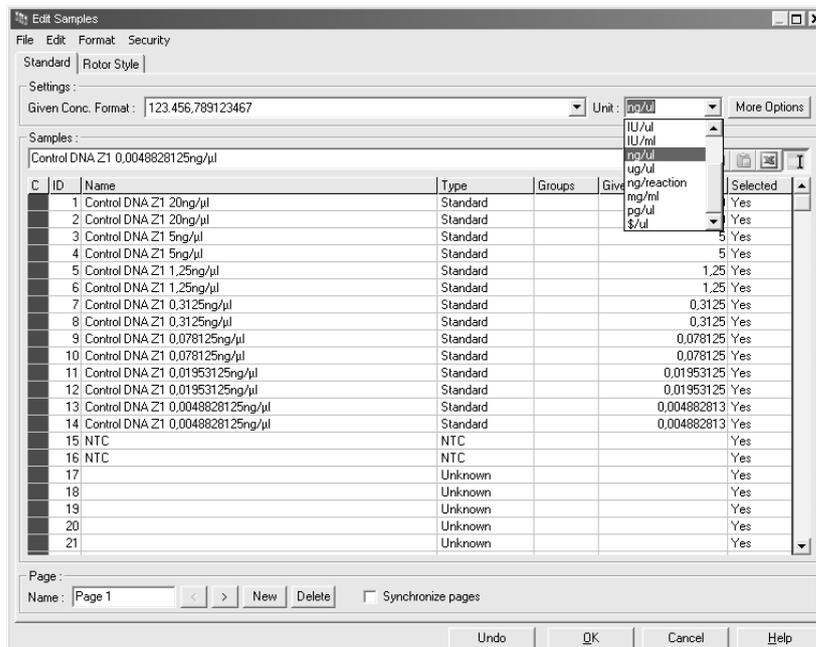
Archivo de plantilla para editar la curva estándar.

5. Si el archivo de plantilla no se carga, utilice el menú desplegable para definir el tipo de muestra en cada uno de los pocillos, p. ej., "Standard" para estándares de ADN y "NTC" para controles sin plantilla.



Edición de muestras en el software Rotor-Gene Q.

- En la columna "Given Conc." (concentración asignada), introduzca la concentración de ADN de los estándares humanos conforme a la Tabla 7 y defina la unidad (ng/μl) en el menú desplegable. Introduzca el nombre de la muestra (p. ej., Control DNA Z1 20 ng/μl).



Edición de las unidades en el software Rotor-Gene Q.

Tabla 7. Concentraciones de ADN de los estándares humanos y masculinos

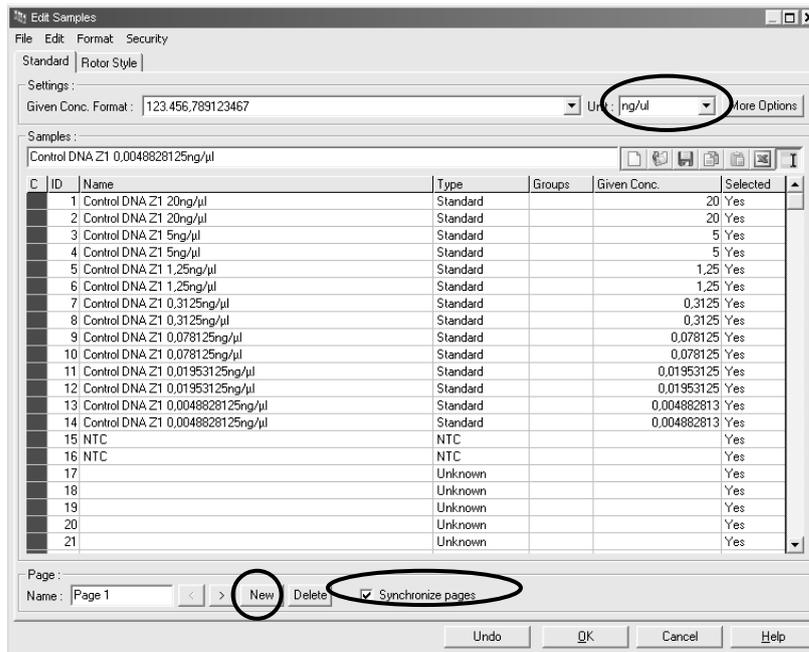
Dilución en serie del ADN de control Z1	Human Standards (estándares humanos) Green Channel (canal verde) Page 1/Human DNA (página 1/ADN humano)	Male Standards (estándares masculinos) Red Channel (canal rojo) Page 2/Male DNA (página 2/ADN masculino)
20 ng/μl	20	6,66
5 ng/μl	5	1,665
1,25 ng/μl	1,25	0,41625
0,3125 ng/μl	0,3125	0,1040625
0,078125 ng/μl	0,078125	0,02601563
0,01953125 ng/μl	0,01953125	0,00650391
0,0048828125 ng/μl	0,0048828125	Ninguno*

* No recomendamos utilizar el último de los valores masculinos (0,001626 ng/μl) para calcular la curva estándar porque en algunos casos, debido a efectos estocásticos, ello podría comprometer la calidad de la curva estándar.

7. Cree dos nuevas páginas haciendo clic en “New” dos veces y seleccionando “Synchronize pages” (sincronizar páginas).

Importante: si no selecciona la casilla “Synchronize pages”, no se adoptarán los nombres de los pocillos para todos los canales.

8. En Page 2/Male DNA, deje el tipo de muestra como “Standard” para estándares de ADN y como “NTC” para controles sin plantilla.

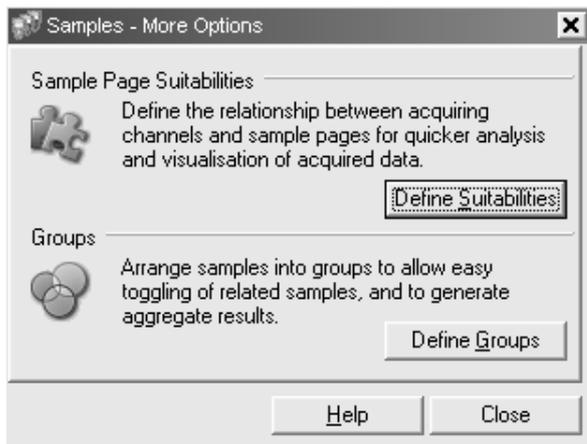


Crear una nueva página de muestras.

9. En Page 2/Male DNA, desmarque la casilla "Synchronize pages". En la columna "Given Conc.", introduzca la concentración de ADN de los estándares masculinos conforme a la Tabla 7 y defina la unidad (ng/μl) en el menú desplegable.

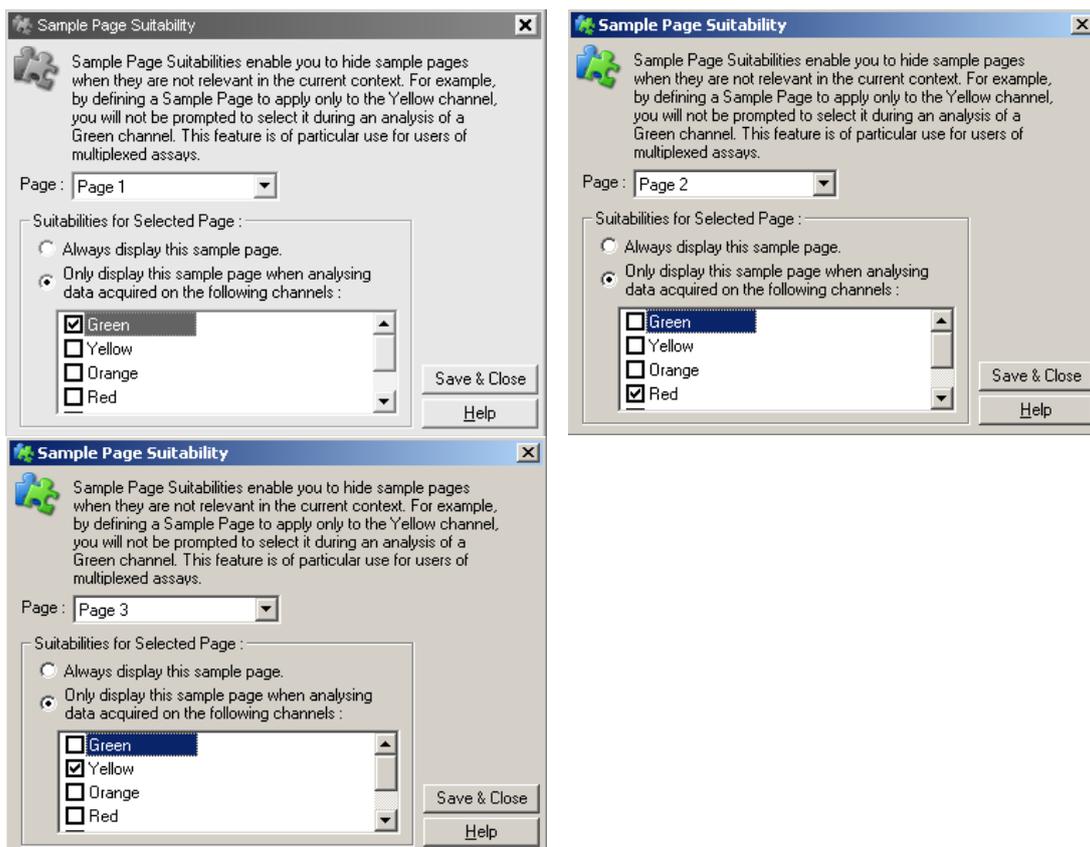
Importante: si no desmarca la casilla "Synchronize pages", se adoptarán las mismas concentraciones tanto para los estándares humanos como para los masculinos, lo que provocará el cálculo erróneo de las concentraciones desconocidas.

10. En Page 3/IC (página 3/IC), deje todas las muestras como "Unknown" (desconocido) en la columna Type (tipo).
11. Abra el menú "More Options" (más opciones) y defina las "Sample Page Suitabilities" (idoneidad de la página de muestras). Seleccione la opción "Only display this sample page when analyzing data" (mostrar esta página de muestras sólo al analizar datos).



Sample Page Suitabilities.

12. Seleccione el canal verde (Green) para la página 1 (Page 1), el canal rojo (Red) para la página 2 (Page 2) y el canal amarillo (Yellow) para la página 3 (Page 3). Haga clic en "Save and Close" (guardar y cerrar). Cierre las Sample Page Suitabilities haciendo clic en "Close".



Selección de canales de color.

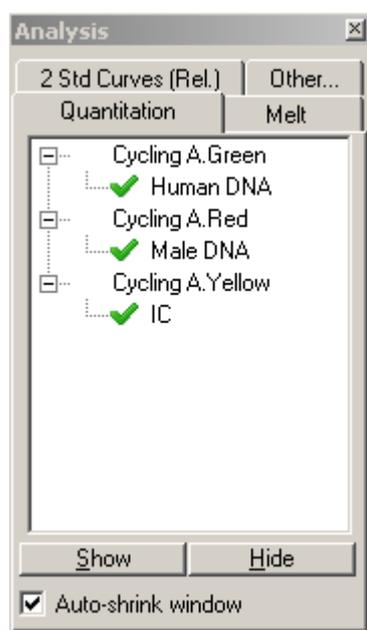
13. Haga clic en "OK" en la pestaña "Edit samples".

14. Para analizar las muestras, abra la herramienta de análisis haciendo clic en "Analysis".



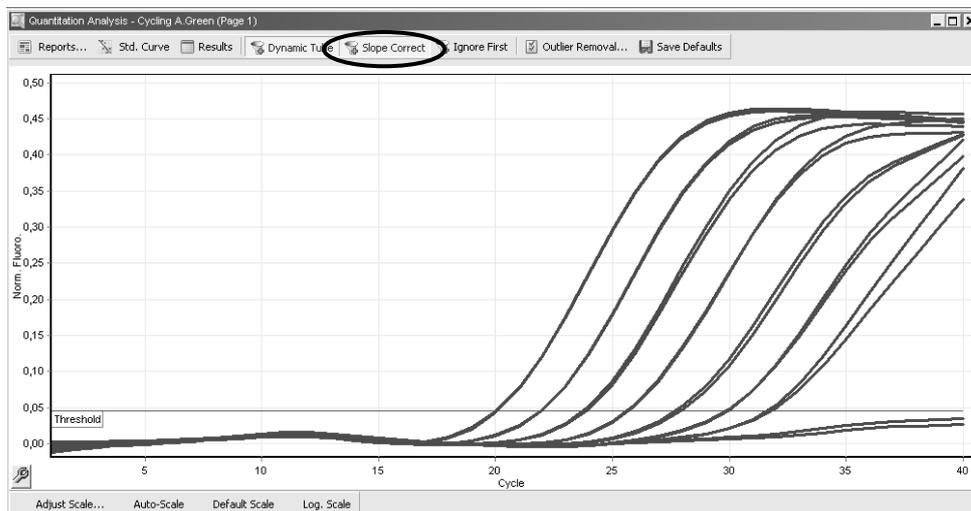
15. En la pestaña Quantitation (determinación cuantitativa), seleccione "Page 1/Human DNA" para el canal verde (Cycling A.Green) y haga clic en "Show" (mostrar). Seleccione "Page 2/Male DNA" para el canal rojo (Cycling A.Red) y "Page 3/IC" ("Página 3/IC") para el canal amarillo (Cycling A.Yellow) y haga clic en "Show". Si la ventana Autofind Threshold (umbral de autobúsqueda) se abre automáticamente, haga clic en "Cancel" (cancelar).

Los esquemas de amplificación para los canales verde y amarillo se muestran en la ventana "Quantitation Analysis" (análisis de la determinación cuantitativa).



Pestaña "Quantitation" en la herramienta Analysis.

16. Active la herramienta "Slope Correction" (corrección de pendiente) para el canal verde.

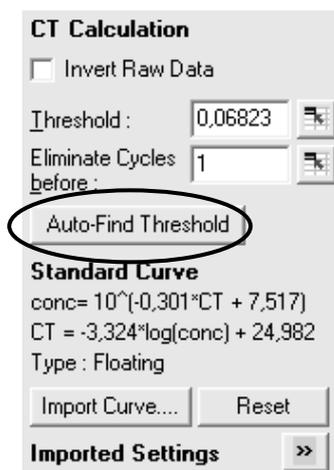


Herramienta "Slope Correction".

17. Seleccione las muestras en la tabla de la derecha. En la parte inferior derecha del panel, seleccione "Auto-Find threshold" para el canal verde.

Los valores C_T se muestran en la ventana "Quantitation Results" (resultados de la determinación cuantitativa).

La configuración del valor umbral adecuado puede requerir una validación interna adicional en su centro de trabajo.

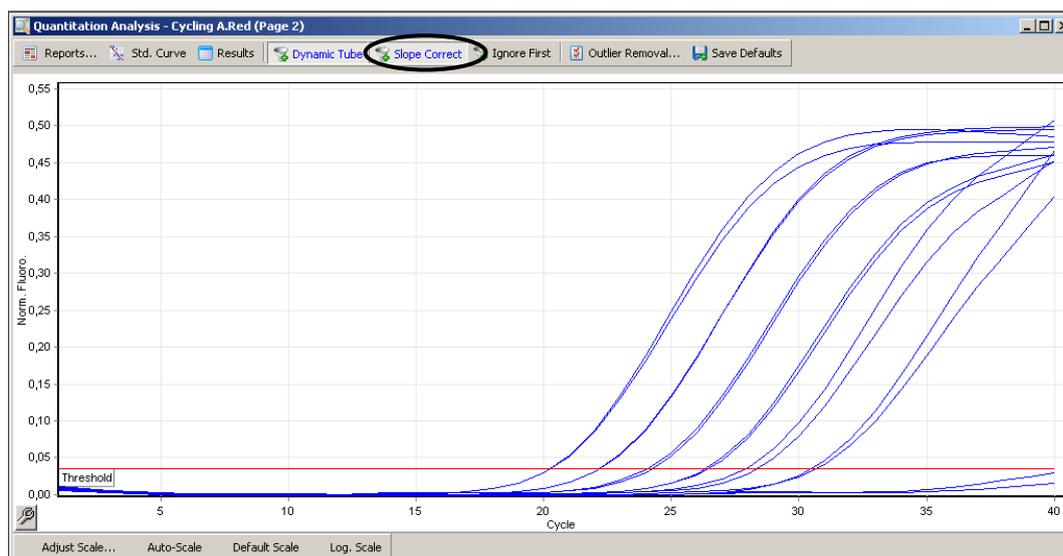


Configuración del valor C_T para el canal verde mediante Auto-Find Threshold.

18. Para el canal rojo, active la herramienta de corrección de pendiente. Seleccione "Auto-Find Threshold" en la parte inferior derecha como se ha mostrado anteriormente para el canal verde.

Los valores C_T se muestran en la ventana "Quantitation Results".

Recomendamos utilizar el Auto-Find Threshold. Si necesita establecer un umbral fijo, quizá sea necesario realizar una validación interna adicional en su centro de trabajo para determinar el valor umbral adecuado.

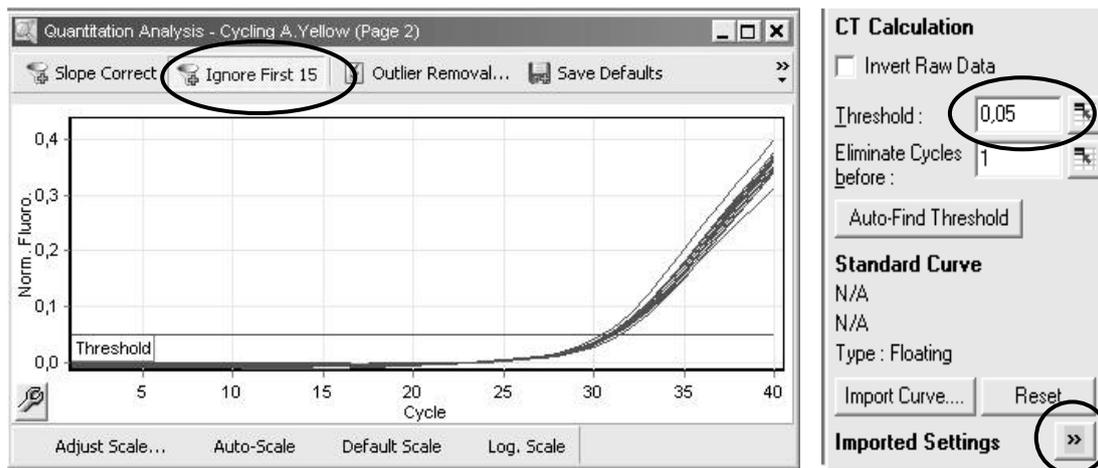


Herramienta de corrección de pendiente.

19. Para el canal amarillo, importe la configuración del "Investigator Quantiplex Kit Analysis Settings for the Yellow Channel file" mediante la herramienta Import (importar) situada en la parte inferior del panel. Consulte la página 13 para obtener información relativa a la descarga de este archivo. Como alternativa, seleccione un valor umbral C_T de 0,05 e ignore los 15 primeros ciclos.

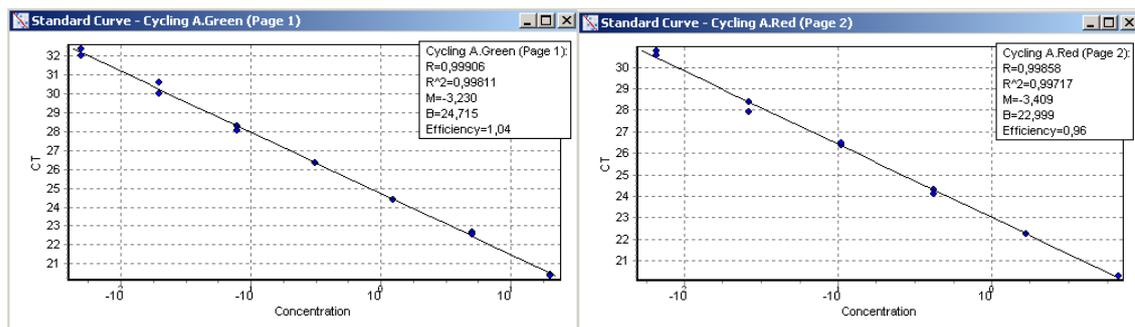
Los valores C_T se muestran en la ventana "Quantitation Results".

La determinación del valor umbral adecuado puede requerir una validación interna adicional en su centro de trabajo.



Configuración del valor C_T para el canal amarillo mediante la herramienta Import.

20. Las curvas estándar se muestran en las ventanas "Standard Curve" para los canales verde y rojo. Vea la línea de regresión calculada y los valores de pendiente (M), intersección Y (B) y R^2 .



Curvas estándar.

21. Vea la concentración de las muestras desconocidas.

Las ventanas "Quantitation Results — Cycling A. Green" (resultados de la determinación cuantitativa para el canal verde) y "Quantitation Results — Cycling A. Red" (resultados de la determinación cuantitativa para el canal rojo) muestran los datos para los pocillos seleccionados y resumen respectivamente la cantidad del ADN total y masculino presente en las muestras desconocidas. La unidad se indica en la parte superior de la columna.

Quant. Results - Cycling A.Green (Page 1)					
No.	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	Rep. C
1	Control DNA Z1 20ng/ul	19,52	20	17,2470721078188	1
2	Control DNA Z1 20ng/ul	19,44	20	18,3273831915359	
3	Control DNA Z1 5ng/ul	21,44	5	4,50331989219853	2
4	Control DNA Z1 5ng/ul	21,44	5	4,50894520177047	
5	Control DNA Z1 1,25ng/ul	23,08	1,25	1,43520840650177	2
6	Control DNA Z1 1,25ng/ul	23,09	1,25	1,42865397027503	
7	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	24,93	0,3125	0,391967554837183	2
8	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	24,87	0,3125	0,411351995887353	
9	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	27,00	0,078125	9,23484827265684E-02	2
10	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	26,85	0,078125	0,102387811075857	
11	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	31,15	0,01953125	5,09634684744197E-03	2
12	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	28,75	0,01953125	2,71489043563741E-02	
13	Control DNA Z1 0,004882813ng/ul	30,85	0,004882813	6,2490161511482E-03	3
14	Control DNA Z1 0,004882813ng/ul		0,004882813		
15	NTC				
16	NTC				
17	pure male DNA	27,31		7,43180085048847E-02	2
18	pure male DNA	27,49		6,55415493834581E-02	
19	Sample 35	28,17		4,08865555737761E-02	2
20	Sample 35	27,92		4,86543	

Ventana "Quantitation Results – Cycling A. Green".

Quant. Results - Cycling A.Red (Page 2)					
No.	Name	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	R
1	Control DNA Z1 20ng/ul	20,23	6,666666667	5,87085833318376	
2	Control DNA Z1 20ng/ul	20,23	6,666666667	5,8924727897786	
3	Control DNA Z1 5ng/ul	22,01	1,666666667	1,73243624588607	
4	Control DNA Z1 5ng/ul	22,02	1,666666667	1,72960899328603	
5	Control DNA Z1 1,25ng/ul	23,95	0,416666667	0,459734070180618	
6	Control DNA Z1 1,25ng/ul	24,18	0,416666667	0,392215428214711	
7	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	26,00	0,104166667	0,112523815266197	
8	Control DNA Z1 0,3125ng/ul	25,86	0,104166667	0,123603489436544	
9	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	27,99	0,026041667	36421785611387E-02	
10	Control DNA Z1 0,078125ng/ul	28,16	0,026041667	35060881170765E-02	
11	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	30,44	0,006510417	35214139382181E-03	
12	Control DNA Z1 0,01953125ng/ul	29,75	0,006510417	37370066312179E-03	
13	Control DNA Z1 0,004882813ng/ul	32,73	0,001627604	1167543506215E-03	
14	Control DNA Z1 0,004882813ng/ul	32,00	0,001627604	32796541243161E-03	
15	NTC				
16	NTC	34,26		39415261617854E-04	
17	pure male DNA	27,32		34350307757923E-02	
18	pure male DNA	27,38		34571934536229E-02	
19	Sample 35	28,56		34012262150628E-02	
20	Sample 35	28,47			

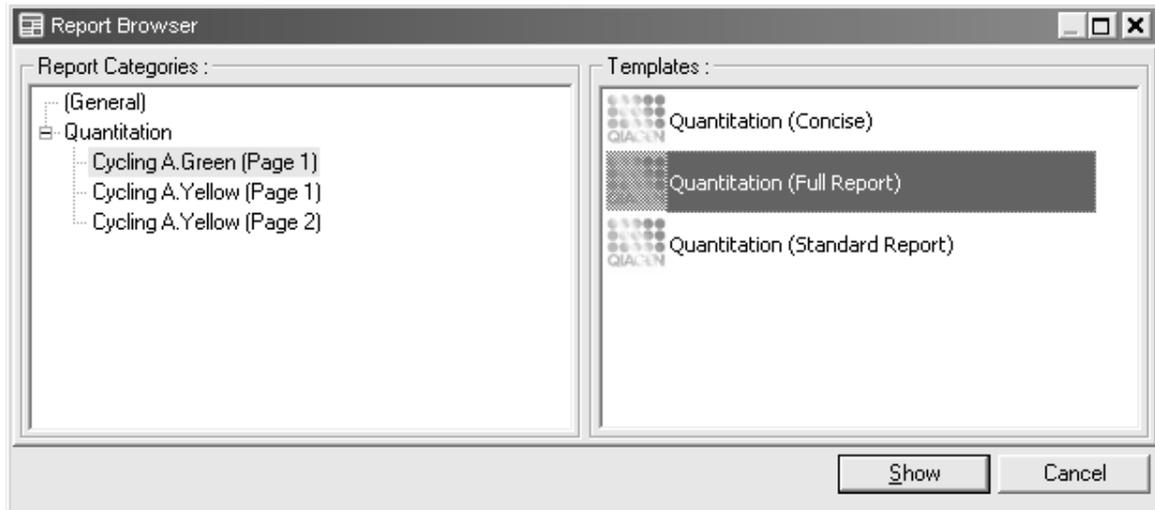
Ventana "Quantitation Results – Cycling A. Red".

La ventana "Quantitation Results – Cycling A. Yellow" (resultados de la determinación cuantitativa para el canal amarillo) muestra los datos para los pocillos seleccionados y resume los valores C_T para el control interno.

No.	Name	Ct	Given Conc (ng/l)	Calc Conc (ng/ul)	Re
1	Control DNA Z1 20ng/μl	29,63			
2	Control DNA Z1 20ng/μl	29,69			
3	Control DNA Z1 5ng/μl	29,47			
4	Control DNA Z1 5ng/μl	29,32			
5	Control DNA Z1 1,25ng/μl	29,18			
6	Control DNA Z1 1,25ng/μl	29,39			
7	Control DNA Z1 0,3125ng/μl	29,39			
8	Control DNA Z1 0,3125ng/μl	29,45			
9	Control DNA Z1 0,078125ng/μl	29,28			
10	Control DNA Z1 0,078125ng/μl	29,44			
11	Control DNA Z1 0,01953125ng/μl	29,22			
12	Control DNA Z1 0,01953125ng/μl	29,17			
13	Control DNA Z1 0,004882813ng/μl	29,30			
14	Control DNA Z1 0,004882813ng/μl	29,43			
15	NTC	29,50			
16	NTC	29,46			
17	pure male DNA	29,45			
18	pure male DNA	29,38			
19	Sample 35	29,42			
20	Sample 35	29,17			

Ventana "Quantitation Results – Cycling A. Yellow".

22. Para exportar los resultados a Excel®, vaya a File, seguido de “Save As” (guardar como) y a continuación a “Excel Analysis Sheet” (hoja de análisis Excel). Los resultados se guardarán en formato *.csv. Para exportar un informe completo, vaya a “File”, después a “Reports” (informes) y finalmente a “Quantitation”.



23. Para interpretar los resultados, vea “Interpretación de resultados” en la página 67.

Protocolo: cuantificación de ADN con Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification

Este protocolo está optimizado para el uso del kit Investigator Quantiplex HYres en el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification con el software HID Real-Time PCR Analysis (versión 1.1).

Para instrucciones generales acerca de la configuración del instrumento y de otras versiones del software, consulte el Manual del usuario del Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification User Manual*).

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 la PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrofóbicos para minimizar la contaminación cruzada.
- Con el kit Investigator Quantiplex HYres, los nuevos colorantes no requieren una calibración a medida al emplear el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. No obstante, hay que comprobar que el sistema esté calibrado para los colorantes estándar VIC, FAM y Cy5 antes de empezar. Consulte el manual de uso del instrumento para una correcta configuración.
- Trabaje siempre según las condiciones de ciclado especificadas en el protocolo. El ciclado está optimizado para este ensayo.
- Utilice siempre el volumen de plantilla especificado en el protocolo. La reacción está optimizada para su uso con 2 μ l de ADN de plantilla. No utilice más o menos de 2 μ l por cada reacción de 20 μ l.
- Las diluciones de estándares de cuantificación de ADN en el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect pueden conservarse a 4 °C durante al menos 1 semana.
- La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste siempre la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Procedimiento

1. Descongele el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

2. Prepare diluciones en serie frescas del ADN de control Z1 conforme a la Tabla 8. Mezcle mediante agitación vorticial durante al menos 5 s y centrifugue cada dilución brevemente antes de extraer una cantidad alícuota para la siguiente dilución. Utilice una nueva punta de pipeta para cada dilución.

Tome precauciones para evitar la contaminación cruzada.

Vea la tabla 1 para obtener información más completa sobre la concentración para las diluciones de la curva estándar.

Tabla 8. Diluciones en serie del ADN de control Z1

Dilución en serie del ADN de control Z1	ADN de control Z1	Tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect
20 ng/ μ l	ADN no diluido	–
5 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
1,25 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,3125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,078125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,01953125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l
0,0048828125 ng/ μ l	10 μ l	30 μ l

3. Descongele los ácidos nucleicos de plantilla. Mezcle la mezcla de reacción FQ y la mezcla de cebador IC YQ invirtiendo los tubos varias veces.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

4. Prepare una mezcla maestra conforme a la Tabla 9.

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

Prepare un volumen de mezcla maestra un 10% mayor que el requerido para el número total de ensayos de PCR que se va a realizar. Tal volumen debería incluir las reacciones de control positivo y negativo.

La preparación de la reacción se puede realizar normalmente a temperatura ambiente (15–25 °C). No obstante, recomendamos mantener los reactivos, las muestras y los controles en hielo o en un dispositivo de enfriamiento.

Tabla 9. Mezcla maestra para la cuantificación de ADN

Componente	Volumen por reacción de 20 μl	Concentración final
Mezcla de reacción FQ	9 μ l	1x
Mezcla de cebador IC YQ	9 μ l	1x
Volumen total de mezcla maestra	18 μl	–

5. Mezcle la mezcla maestra meticulosamente y vierta 18 μ l en los pocillos de una placa de PCR.

6. Añada 2 μ l de tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect a los pocillos de NTC.

Asegúrese de que los pocillos de NTC no entran en contacto con ADN humano.

7. Añada 2 μ l de diluciones de ADN de control o 2 μ l de ADN de muestra desconocida a los pocillos individuales y mezcle meticulosamente. Cierre la placa.

Mezcle cuidadosamente para evitar las concentraciones localizadas de sal.

La Tabla 10 muestra una posible configuración de placa. Asegúrese de que la mezcla maestra y la plantilla están mezcladas meticulosamente. Es necesario realizar ciclos por duplicado de las diluciones del ADN de control para cada ensayo y en cada placa de reacción.

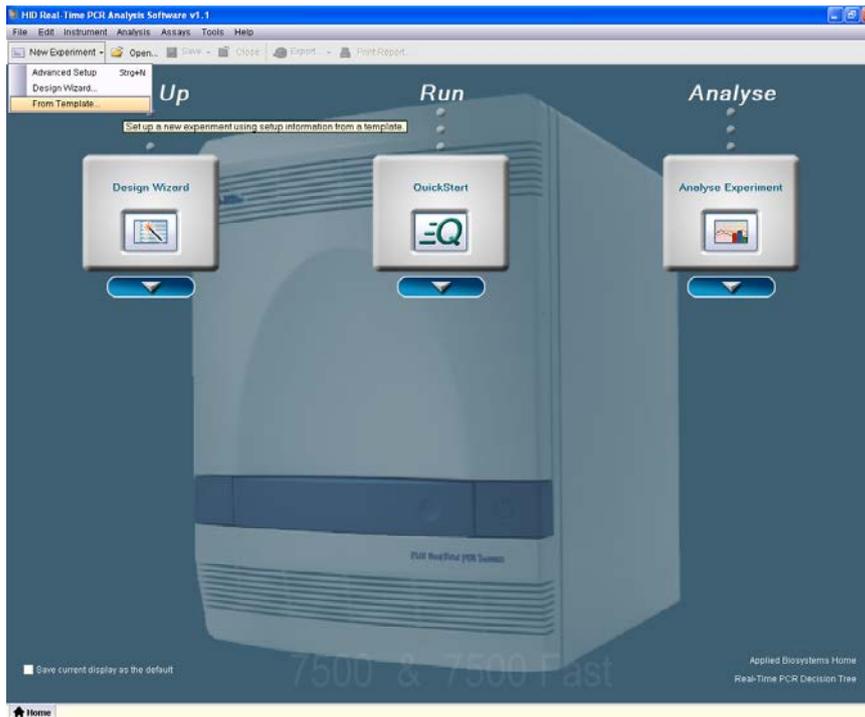
Tabla 10. Posible configuración de placa de reacciones en el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification

Contenido de los pocillos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20	20	5	5	1,25	1,25	0,3125	0,3125	0,0781	0,0781	0,0195	0,0195
B	0,0049	0,0049	NTC	NTC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
C	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
D	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
E	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
F	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
G	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
H	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC

Todas las cantidades están expresadas en ng/ μ l. DESC: muestra desconocida.

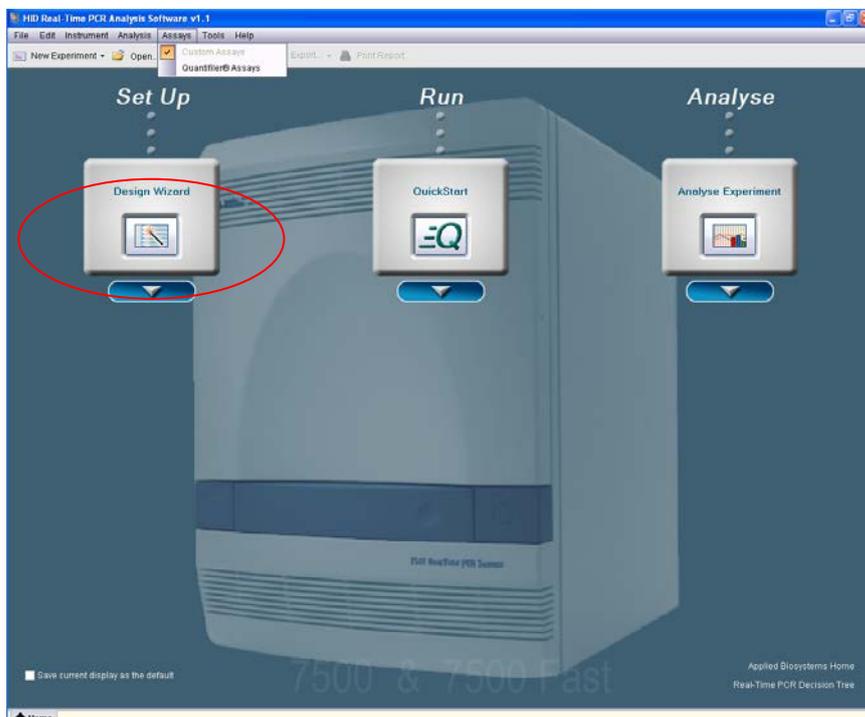
- 8. Abra el software HID Real-Time PCR Analysis (versión 1.1) en el Custom Assays Mode (modo de ensayos a medida).**
- 9. Si está utilizando un archivo de plantilla, seleccione "New Experiment From Template" (nuevo experimento a partir de plantilla) y proceda al paso 13 para asignar las "Targets" (dianas) al "Plate Layout" (diseño de placa). A continuación continúe con el paso 17 para guardar e iniciar el ciclo.**

El archivo de plantilla carga todos los ajustes necesarios para comenzar un ciclo Investigator Quantiplex HYres, incluidos los ajustes de la curva estándar, el perfil de ciclado y las dianas necesarias para la adquisición de fluorescencia.

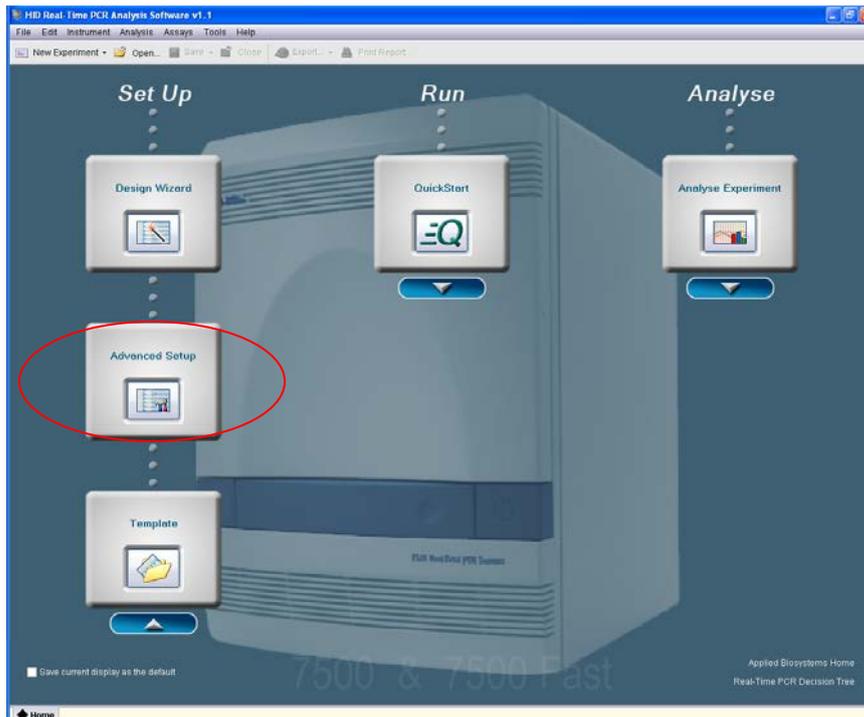


Comienzo de un nuevo experimento a partir de una plantilla.

10. Si no está utilizando archivos de plantilla, seleccione “Advanced Setup” (configuración avanzada) haciendo clic en la flecha bajo el “Design Wizard” (asistente de diseño).



Comienzo de un nuevo experimento.



Comienzo de un nuevo experimento con la configuración avanzada.

11. Una vez que se abra la nueva ventana, introduzca un nuevo “Experiment Name” (nombre de experimento) en el campo correspondiente.

Seleccione los siguientes ajustes:

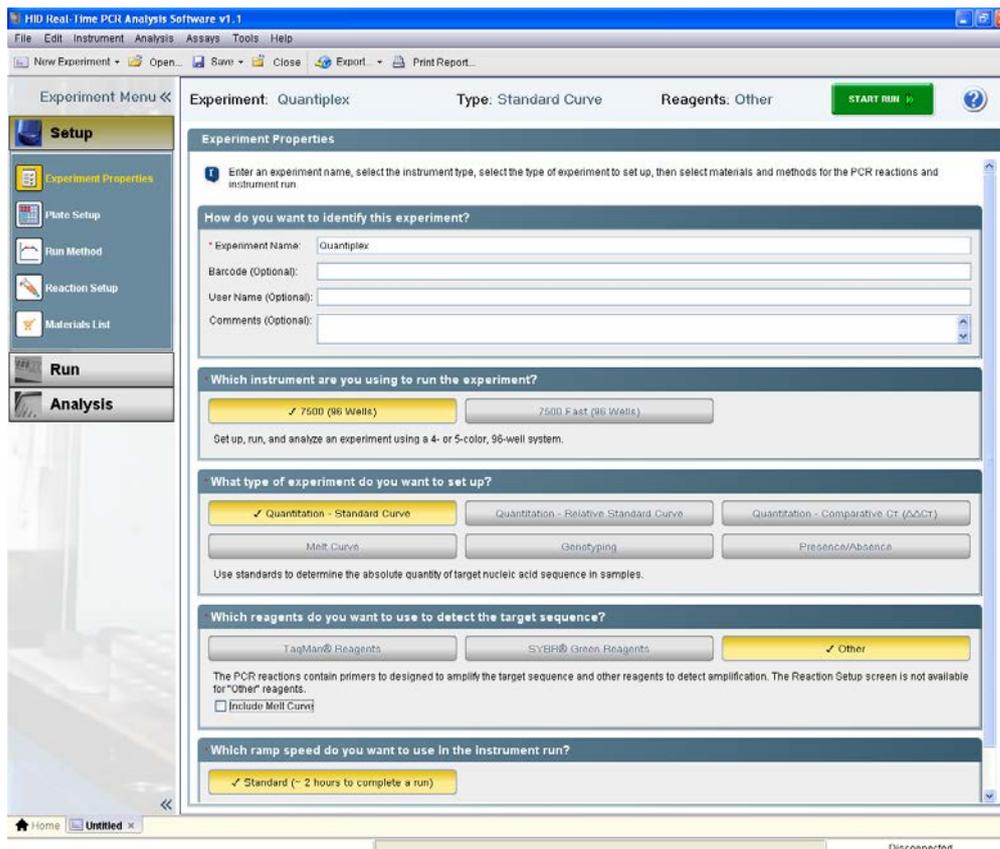
Instrument (instrumento): 7500 (96 Wells) [96 pocillos]

Experiment Type (tipo de experimento): Quantitation (determinación cuantitativa) — Standard curve (curva estándar)

Reagents (reactivos): Other (otros)

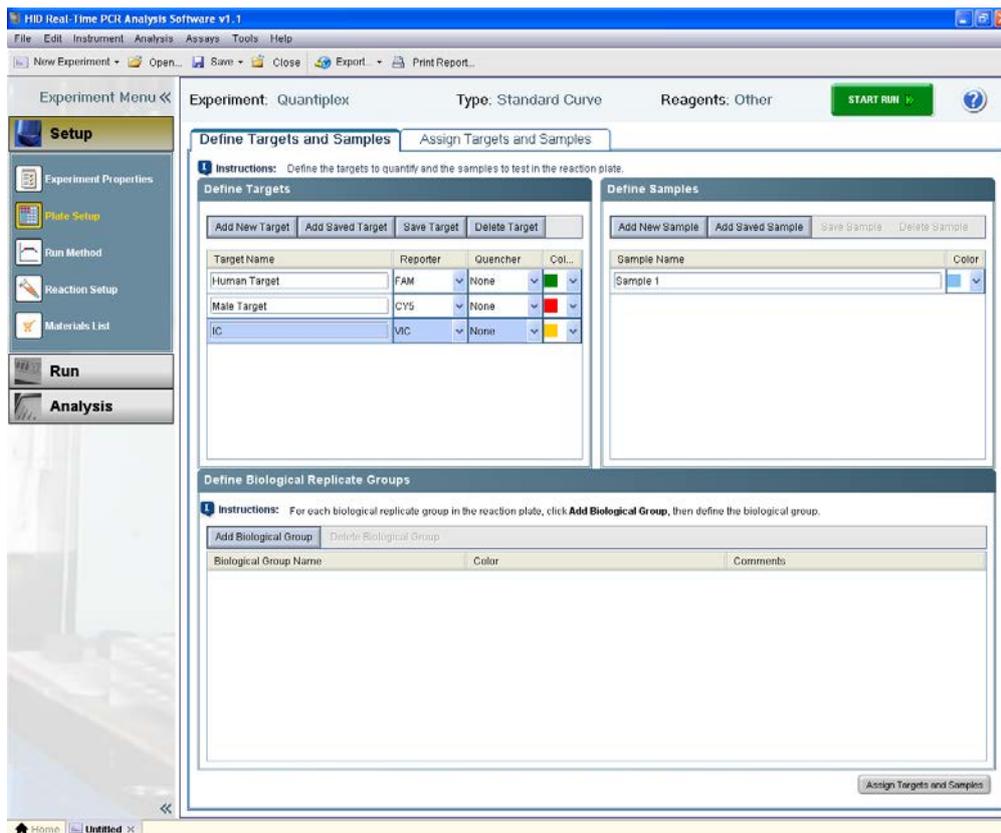
Ramp Speed (velocidad de incremento): Standard (estándar)

Desmarque la opción “Include Melt Curve” (incluir curva de disociación).



12. Haga clic en **Plate Setup** (configuración de placa) y defina 3 **Targets** haciendo doble clic en **“Add New Target”** (añadir una nueva diana). Seleccione los siguientes ajustes:

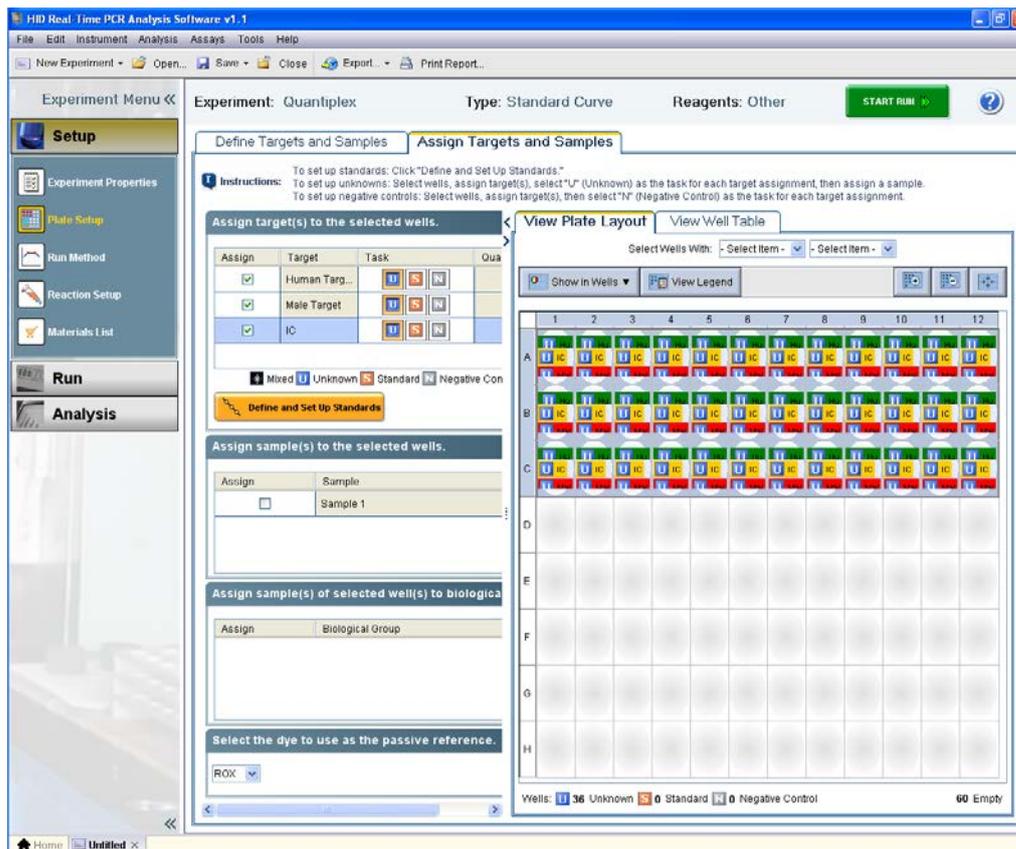
- Human Target (diana humana):** Reporter FAM (FAM indicador),
- Quencher (supresor de señal):** None (ninguno)
- Male Target (diana masculina):** Reporter Cy5 (Cy5 indicador),
- Quencher:** None
- IC:** Reporter VIC (VIC indicador), **Quencher:** None



13. Defina los nombres de "Sample" (muestra) mediante la herramienta "Define Samples" (definir muestras) del panel derecho.

14. Cambie a la pestaña "Assign Targets and Samples" (asignar dianas y muestras). En el "Plate Layout", seleccione los pocillos en uso y asigne las tres "Targets" marcando las casillas.

Importante: no resalte los pocillos que no estén en uso (es decir, los que no tienen mezcla de reacción). La inclusión de pocillos no utilizados puede tener un impacto significativo en la escala de los ejes X e Y al visualizar los datos.



Asignación de las Targets.

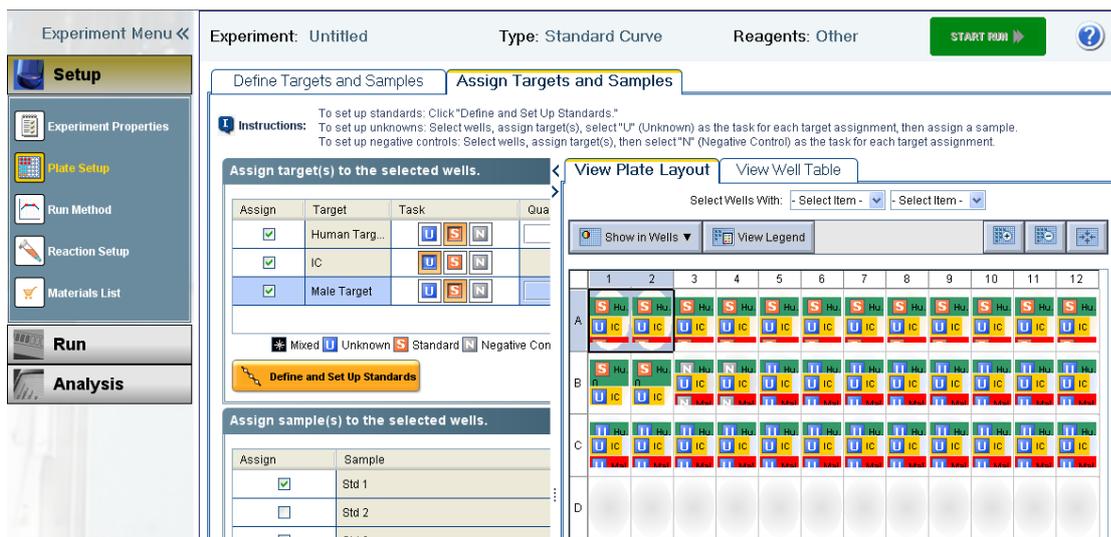
15. Seleccione los pocillos para los “No-Template Controls” (controles sin plantilla) y márkuelos como “Negative Control” (control negativo) mediante el botón rojo “N”.

Nota: deje la columna Task (tarea) del IC (VIC) para reacciones NTC marcadas como “Unknown” (desconocido). Introduzca el nombre de la muestra.

16. Seleccione los pocillos para la curva estándar y márkuelos como “Standard” mediante el botón rojo “S”. Seleccione “Quantity” (cantidad) para el detector correspondiente e introduzca la cantidad de ADN en el pocillo conforme a la Tabla 11.

Importante: aunque no se introduzcan unidades para “Quantity”, es necesario utilizar una unidad común para todas las cantidades estándar (p.ej., ng/ μ l). Las unidades utilizadas para las cantidades estándar determinan las unidades de cuantificación para el análisis de los resultados.

Nota: deje la columna Task del IC (VIC) para reacciones estándar marcada como “Unknown”. Introduzca el nombre de la muestra.



Configuración de la curva estándar y asignación de las muestras al diseño de placa.

Tabla 11. Concentraciones de ADN de los estándares humanos y masculinos

Dilución en serie del ADN de control Z1	Human Target (diana humana)(FAM)	Male Target (diana masculina) (Cy5)
20 ng/ μ l	20	6,66
5 ng/ μ l	5	1,665
1,25 ng/ μ l	1,25	0,41625
0,3125 ng/ μ l	0,3125	0,1040625
0,078125 ng/ μ l	0,078125	0,02601563
0,01953125 ng/ μ l	0,01953125	0,00650391
0,0048828125 ng/ μ l	0,0048828125	Ninguno*

* No recomendamos utilizar el último de los valores masculinos (0,001626 ng/ μ l) para calcular la curva estándar porque en algunos casos, debido a efectos estocásticos, ello podría comprometer la calidad de la curva estándar.

17. Asigne las muestras al diseño de placa haciendo clic en los pocillos y marcando la casilla correspondiente en el panel izquierdo.

18. Haga clic en “Run Method” (método de ciclo). Programe el ciclador conforme a la Tabla 12.

La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C durante 3 minutos para activar la ADN polimerasa.

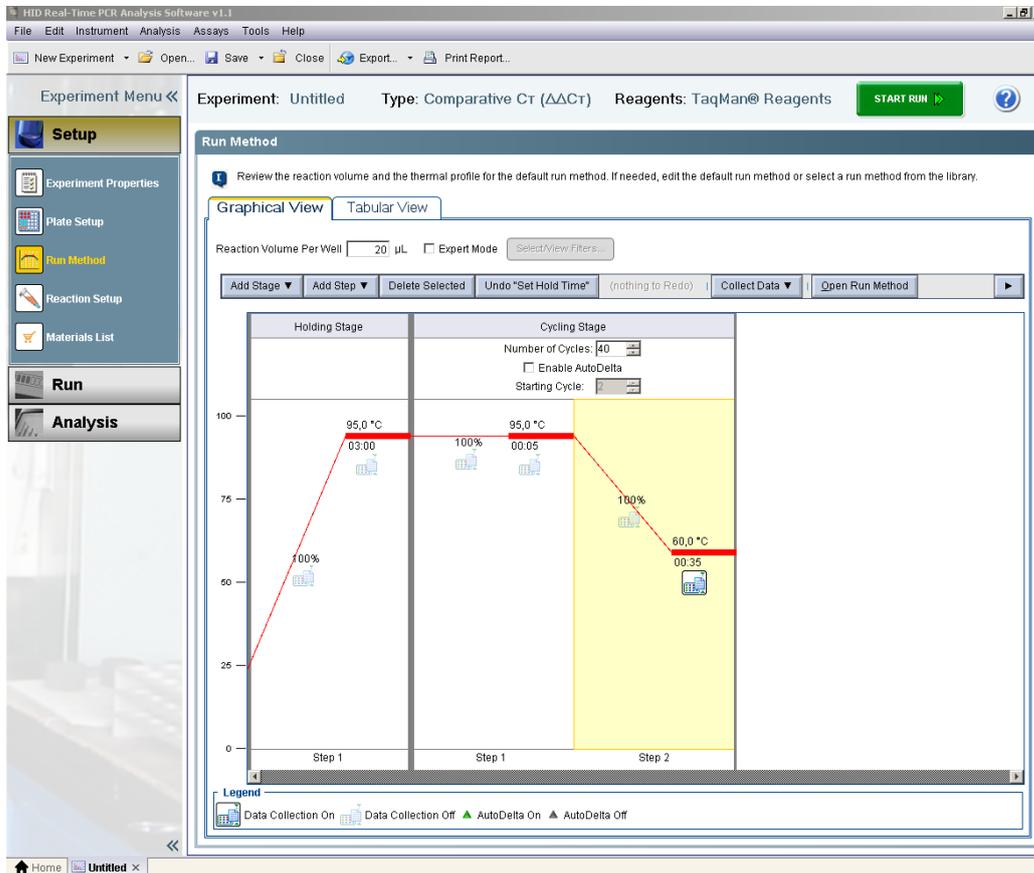
La PCR de ciclado en dos pasos requiere 40 ciclos. Cada ciclo comprende 2 pasos: a 95 °C durante 5 s (paso de desnaturalización) y a 60 °C durante 35 s (paso de *annealing*/extensión).

Tabla 12. Condiciones de ciclado para el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System for Human Identification

Paso	Temp	Tiempo	Número de ciclos	Comentarios adicionales
Paso inicial de activación de la PCR	95 °C	3 min	–	La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C para activar la ADN polimerasa
Ciclado de dos pasos:				
desnaturalización	95 °C	5 s	40 ciclos	
<i>annealing</i> /extensión combinada	60 °C	35 s		Realice la recogida de datos de fluorescencia

19. En el perfil térmico, cambie los tiempos de pausa a los indicados en la Tabla 12. Cambie el volumen de Sample a 20 μ l.

La adquisición de datos debe realizarse durante el paso de *annealing*/extensión combinada.



Ajuste del perfil térmico (software HID Real-Time PCR Analysis v1.1).

20. Antes de ejecutar la placa de reacción, guarde el documento de placa como un archivo EDS Document (*.eds). Haga clic en "File" (archivo) y después en "Save" (guardar). Introduzca un nombre para el documento de placa y haga clic de nuevo en "Save".

21. Cargue la placa en el instrumento.

Asegúrese de que la posición A1 de la placa está situada en el extremo superior izquierdo de la bandeja.

22. Inicie la reacción haciendo clic en "Start" (inicio).

Análisis de datos

La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Procedimiento

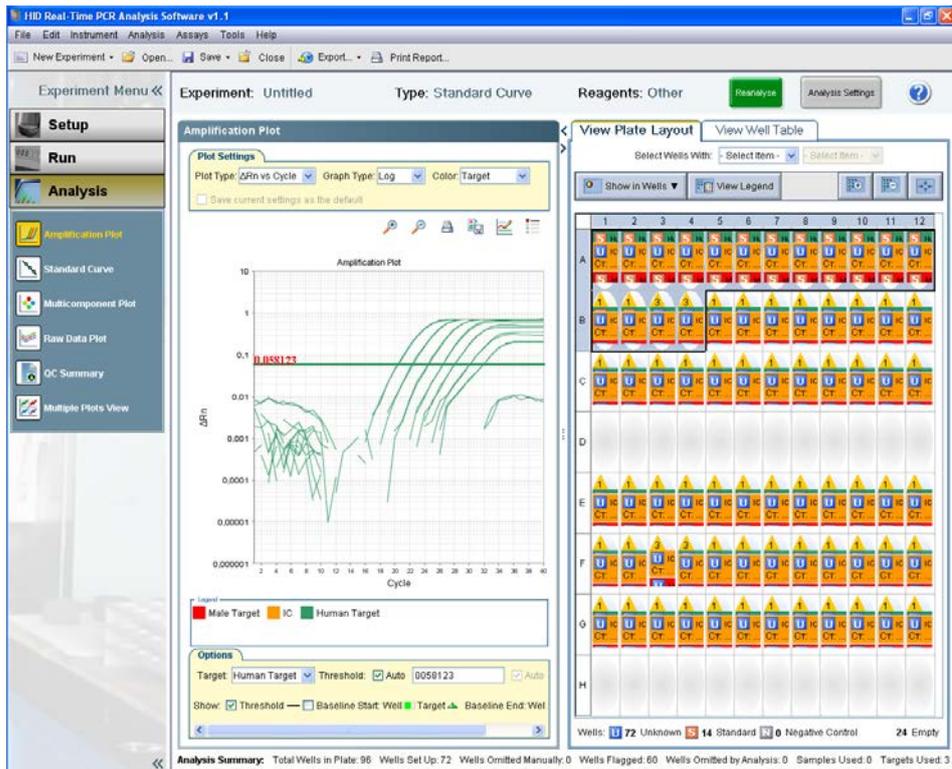
1. **Abra el archivo del ciclo con el software HID Real-Time PCR Analysis v1.1. En primer lugar tendrá que abrir el software en el "Custom Assays Mode". A continuación haga clic en "Open" (abrir) y después en "Browse" (examinar) para localizar el archivo guardado.**
2. **Antes de crear una curva estándar es necesario definir los estándares. Si los estándares ya fueron definidos antes de iniciar el ciclo, siga con el paso 4.**
3. **Vaya a "Setup" (configuración) y seleccione "Plate Setup". Defina los pocillos que contienen estándares de ADN como se explica en el paso 14.**

Importante: aunque no se introduzcan unidades para Quantity, es necesario utilizar una unidad común para todas las cantidades estándar (p.ej., ng/ μ l). Las unidades utilizadas para las cantidades estándar determinan las unidades de cuantificación para el análisis de los resultados.

Nota: deje la columna Task del IC (VIC) para reacciones estándar marcada como "Unknown". Introduzca el nombre de la muestra (p. ej., Control DNA Z1 20 ng/ μ l).

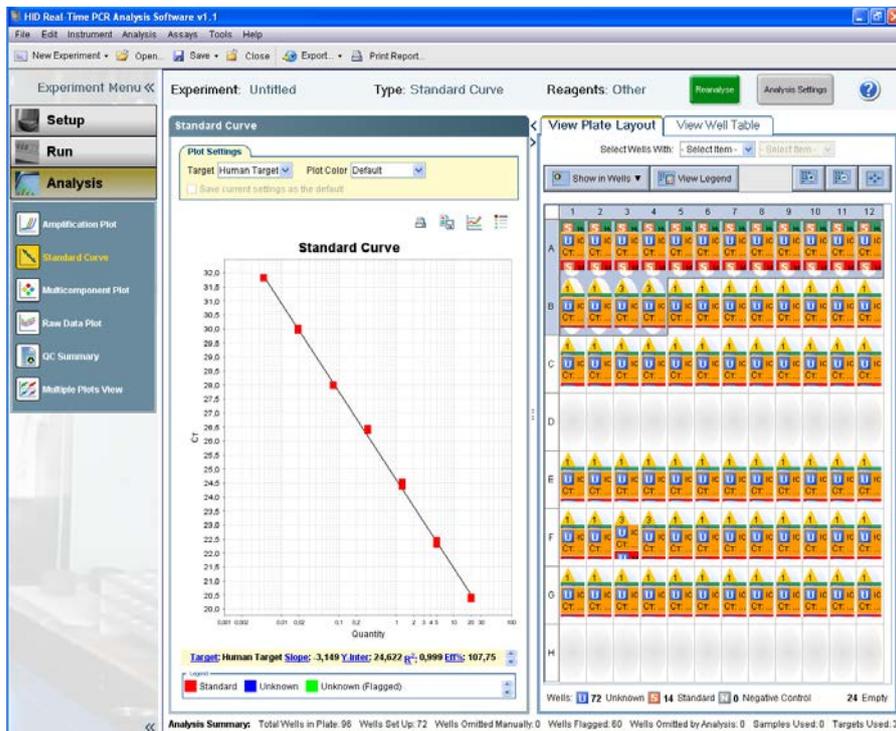
4. **En la pestaña "Amplification Plot" (esquema de amplificación), localizable en la pestaña "Analysis" (análisis), seleccione las muestras adecuadas en la tabla situada bajo el esquema de amplificación. Elija "Auto Ct" (cálculo automático) para ambos canales y haga clic en "Analyze" (analizar).**

La configuración del valor umbral adecuado puede requerir una validación interna adicional en su centro de trabajo.



Análisis de muestras para los canales FAM, Cy5 y VIC.

- Para ver la curva estándar, seleccione la pestaña "Standard Curve", localizable en la pestaña "Results" (resultados). Consulte los valores C_T para las reacciones estándar de cuantificación y la línea de regresión calculada, así como los valores de pendiente, R^2 e intersección Y.



Curva estándar.

6. Vea la concentración de las muestras desconocidas

La "Well Table" (tabla de pocillos) muestra los datos de los pocillos seleccionados e indica la cantidad de ADN presente en las muestras desconocidas. La "Human Target" muestra la cantidad de ADN presente con las mismas unidades empleadas para los estándares (es decir, si se utilizó ng/ μ l para la definición de los estándares, las cantidades para las desconocidas se indicarán en ng/ μ l). La "Male Target" muestra la cantidad de ADN masculino presente con las mismas unidades empleadas para los estándares.

La "IC Target" (diana de control interno) muestra el valor C_T para el control interno.



#	Well	Sample No.	Target Name	Task	Ct	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	HIGHSD
1	A1	Std 1	Human Target	STANDARD	20,428	20,397	0,044	20			
2	A1	Std 1	IC	UNKNOWN	24,784	24,887	0,145				
3	A1	Std 1	Male Target	STANDARD	21,811	21,794	0,024	8,66			
4	A2	Std 1	Human Target	STANDARD	20,366	20,397	0,044	20			
5	A2	Std 1	IC	UNKNOWN	24,989	24,887	0,145				
6	A2	Std 1	Male Target	STANDARD	21,776	21,794	0,024	8,66			
7	A3	Std 2	Human Target	STANDARD	22,301	22,377	0,108	5			
8	A3	Std 2	IC	UNKNOWN	24,750	24,866	0,163				
9	A3	Std 2	Male Target	STANDARD	23,640	23,746	0,149	1,665			
10	A4	Std 2	Human Target	STANDARD	22,454	22,377	0,108	5			
11	A4	Std 2	IC	UNKNOWN	24,981	24,866	0,163				
12	A4	Std 2	Male Target	STANDARD	23,851	23,746	0,149	1,665			
13	A5	Std 3	Human Target	STANDARD	24,392	24,462	0,098	1,25			
14	A5	Std 3	IC	UNKNOWN	24,771	24,761	0,013				
15	A5	Std 3	Male Target	STANDARD	25,859	25,913	0,077	0,416			
16	A6	Std 3	Human Target	STANDARD	24,531	24,462	0,098	1,25			
17	A6	Std 3	IC	UNKNOWN	24,752	24,761	0,013				
18	A6	Std 3	Male Target	STANDARD	25,968	25,913	0,077	0,416			
19	A7	Std 4	Human Target	STANDARD	26,459	26,42	0,056	0,312			
20	A7	Std 4	IC	UNKNOWN	24,634	24,892	0,365				
21	A7	Std 4	Male Target	STANDARD	27,915	27,841	0,105	0,104			
22	A8	Std 4	Human Target	STANDARD	26,380	26,42	0,056	0,312			
23	A8	Std 4	IC	UNKNOWN	25,150	24,892	0,365				
24	A8	Std 4	Male Target	STANDARD	27,767	27,841	0,105	0,104			

Concentración de muestra desconocida.

7. Para exportar y guardar el informe de resultados, vaya a "File", después a "Export" (exportar) y finalmente a "Results". Es necesario guardar la configuración de análisis primero para después guardar los resultados en el formato "Results Export Files *.csv".
8. Para interpretar los resultados, véase "Interpretación de resultados" en la página 67.

Protocolo: cuantificación de ADN con los sistemas Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR

Este protocolo está optimizado para el uso del kit Investigator Quantiplex HYres en el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System con la versión 1.4 del software SDS.

Para instrucciones generales acerca de la configuración del instrumento y otras versiones del software, consulte el Manual del usuario del Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System User Manual*).

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 la PCR (post-PCR).
- Utilice puntas desechables con filtros hidrofóbicos para minimizar la contaminación cruzada.
- Con el kit Investigator Quantiplex HYres, los nuevos colorantes no requieren una calibración a medida al emplear el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. No obstante, hay que comprobar que el sistema esté calibrado para los colorantes estándar VIC, FAM y Cy5 antes de empezar. Consulte el manual de uso del instrumento para una correcta configuración.
- Adopte las condiciones de ciclado especificadas en el protocolo. El ciclado está optimizado para este ensayo.
- Utilice el volumen de plantilla especificado en el protocolo. La reacción está optimizada para su uso con 2 μ l de ADN de plantilla. No utilice más o menos de 2 μ l por cada reacción de 20 μ l.
- Las diluciones de estándares de cuantificación de ADN en el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect pueden conservarse a 4 °C durante al menos 1 semana.
- La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Procedimiento

1. Descongele el tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

2. Prepare diluciones en serie frescas del ADN de control Z1 conforme a la Tabla 13. Mezcle mediante agitación vorticial durante al menos 5 s y centrifugue cada dilución brevemente antes de extraer una cantidad alícuota para la siguiente dilución. Utilice una nueva punta de pipeta para cada dilución.

Tome precauciones para evitar la contaminación cruzada.

Vea la tabla 16 para obtener información más completa sobre la concentración para las diluciones de la curva estándar.

Tabla 13. Diluciones en serie del ADN de control Z1

Dilución en serie del ADN de control Z1	ADN de control Z1	Tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect
20 ng/μl	ADN no diluido	–
5 ng/μl	10 μl	30 μl
1,25 ng/μl	10 μl	30 μl
0,3125 ng/μl	10 μl	30 μl
0,078125 ng/μl	10 μl	30 μl
0,01953125 ng/μl	10 μl	30 μl
0,0048828125 ng/μl	10 μl	30 μl

3. Descongele los ácidos nucleicos de plantilla. Mezcle la mezcla de reacción FQ y la mezcla de cebador IC YQ invirtiendo los tubos varias veces.

Mezcle todas las soluciones meticulosamente antes de usarlas para evitar las concentraciones localizadas de sal.

4. Prepare una mezcla maestra conforme a la Tabla 14.

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

Prepare un volumen de mezcla maestra un 10% mayor que el requerido para el número total de ensayos de PCR que se va a realizar. Tal volumen debería incluir las reacciones de control positivo y negativo.

La preparación de la reacción se puede realizar normalmente a temperatura ambiente (15–25 °C). No obstante, recomendamos mantener los reactivos, las muestras y los controles en hielo o en un dispositivo de enfriamiento.

Tabla 14. Mezcla maestra para la cuantificación de ADN

Componente	Volumen por reacción de 20 μl	Concentración final
Mezcla de reacción FQ	9 μ l	1x
Mezcla de cebador IC YQ	9 μ l	1x
Volumen total de mezcla maestra	18 μl	–

- 5. Mezcle la mezcla maestra meticulosamente y vierta 18 μ l en los pocillos de una placa de PCR.**
- 6. Añada 2 μ l de tampón para dilución de ácidos nucleicos QuantiTect a los pocillos de NTC.**

Asegúrese de que los pocillos de NTC no entran en contacto con ADN humano.

- 7. Añada 2 μ l de diluciones de ADN de control o 2 μ l de ADN de muestra desconocida a los pocillos individuales y mezcle meticulosamente. Cierre la placa.**

Mezcle cuidadosamente para evitar las concentraciones localizadas de sal y de ADN.

La Tabla 15 muestra una posible configuración de placa. Asegúrese de que la mezcla maestra y la plantilla están mezcladas meticulosamente. Es necesario realizar ciclos por duplicado de las diluciones del ADN de control para cada ensayo y en cada placa de reacción.

Tabla 15. Posible configuración de placa de reacciones en los sistemas de Applied Biosystems 7500 y 7500 Fast Real-Time PCR

Contenido de los pocillos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20	20	5	5	1,25	1,25	0,3125	0,3125	0,0781	0,0781	0,0195	0,0195
B	0,0049	0,0049	NTC	NTC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC	DESC
C	DESC	DESC	DESC									
D	DESC	DESC	DESC									
E	DESC	DESC	DESC									
F	DESC	DESC	DESC									
G	DESC	DESC	DESC									
H	DESC	DESC	DESC									

Todas las cantidades están expresadas en ng/μl. DESC: muestra desconocida.

8. Abra el “Sequence Detection Software” (software de detección de secuencias) y seleccione “Create a New Document” (crear un nuevo documento). Haga clic en “Next” (siguiente) para continuar.

Si no está usando un archivo de plantilla de la página del producto Investigator Quantiplex HYres, seleccione lo siguiente en la ventana del “New Document Wizard” (asistente para nuevo documento).

Assay (ensayo): Standard Curve (Absolute Quantification) [curva estándar (cuantificación absoluta)]

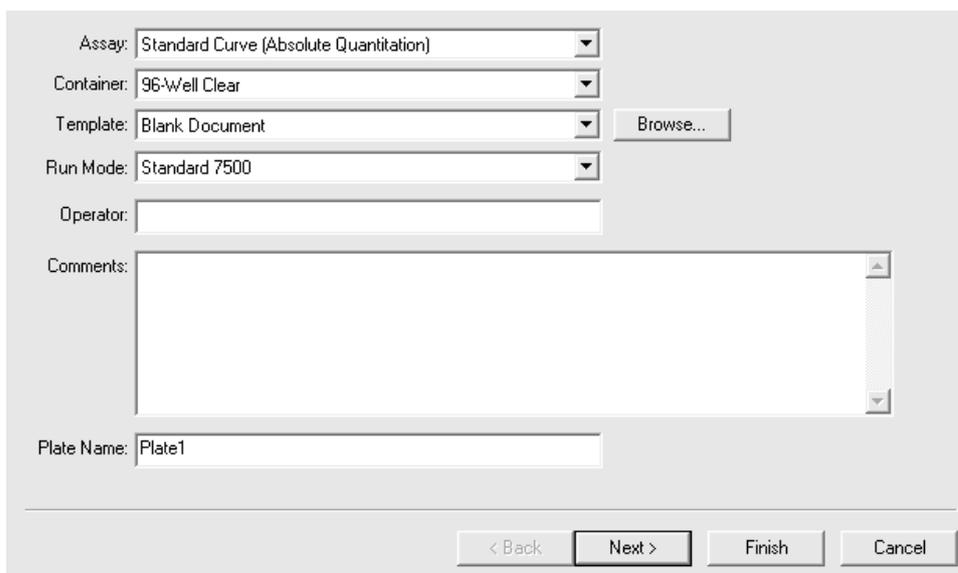
Container (recipiente): 96-Well Clear (placa transparente de 96 pocillos)

Template (plantilla): Blank Document (documento en blanco)

Run Mode (modo de ciclo) para el sistema de PCR en tiempo real

7500: Standard 7500

Run Mode para el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast: Standard 7500



Creación de un nuevo documento.

Si está utilizando un archivo de plantilla, seleccione lo siguiente y siga con el paso 12.

Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)

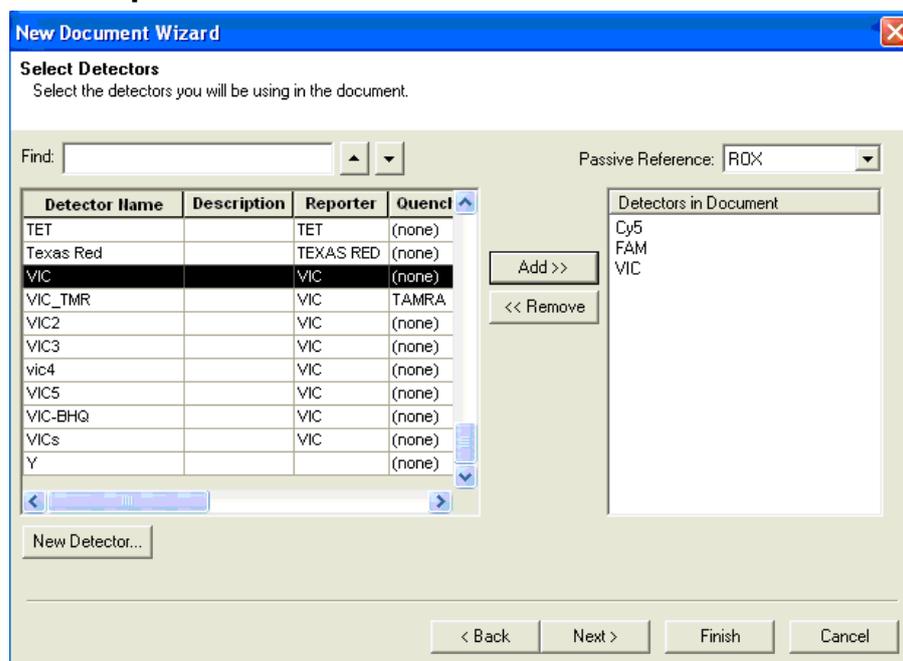
Container: 96-Well Clear

Template: Investigator_Quantiplex HYres_Template_SDS1.4.SDT

Run Mode para el sistema de PCR en tiempo real 7500: Standard
7500

Run Mode para el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast: Standard
7500

9. **Añada los detectores FAM, VIC y Cy5 al documento. Haga clic en "Next" para continuar.**



Selección de los detectores.

10. **Seleccione los pocillos en uso y marque la casilla para los tres detectores.**

Importante: no resalte los pocillos que no estén en uso (es decir, los que no tienen mezcla de reacción). La inclusión de pocillos no utilizados puede tener un impacto significativo en la escala de los ejes X e Y al visualizar los datos.

Introduzca las concentraciones de la curva estándar en los pocillos que contienen las reacciones de control para los detectores FAM y Cy5.

11. **Haga clic en "Unknown" (desconocido) en la columna Task (tarea) y seleccione entonces "Standard" (estándar) en el menú desplegable. Seleccione "Quantity" (cantidad) para el detector correspondiente e introduzca la cantidad de ADN en el pocillo conforme a la Tabla 16.**

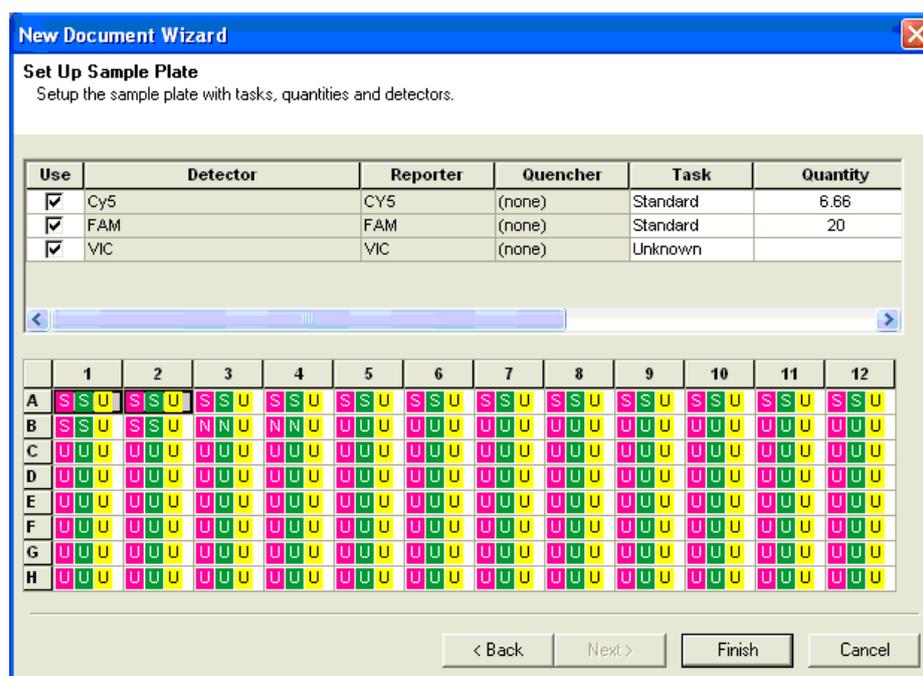
Importante: aunque no se introduzcan unidades para Quantity, es necesario utilizar una unidad común para todas las cantidades estándar (p.ej., ng/ μ l). Las unidades utilizadas para las cantidades estándar determinan las unidades de cuantificación para el análisis de los resultados.

Nota: deje la columna Task del detector VIC para reacciones estándar marcada como "Unknown". Introduzca el nombre de la muestra (p. ej., Control DNA Z1 20 ng/μl).

Tabla 16. Concentraciones de ADN de los estándares humanos y masculinos

Dilución en serie del ADN de control Z1	Human Target (FAM) (diana humana, FAM)	Male Target (Cy5) (diana masculina, Cy5)
20 ng/μl	20	6,66
5 ng/μl	5	1,665
1,25 ng/μl	1,25	0,41625
0,3125 ng/μl	0,3125	0,1040625
0,078125 ng/μl	0,078125	0,02601563
0,01953125 ng/μl	0,01953125	0,00650391
0,0048828125 ng/μl	0,0048828125	Ninguno*

* No recomendamos utilizar el último de los valores masculinos (0,001626 ng/μl) para calcular la curva estándar porque en algunos casos, debido a efectos estocásticos, ello podría comprometer la calidad de la curva estándar.



Configuración de la placa de muestras.

12. Haga clic en “Finish” (finalizar). Para programar el ciclador conforme a la Tabla 17, haga clic en la pestaña “Instrument” (instrumento).

La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C durante 3 minutos para activar la ADN polimerasa.

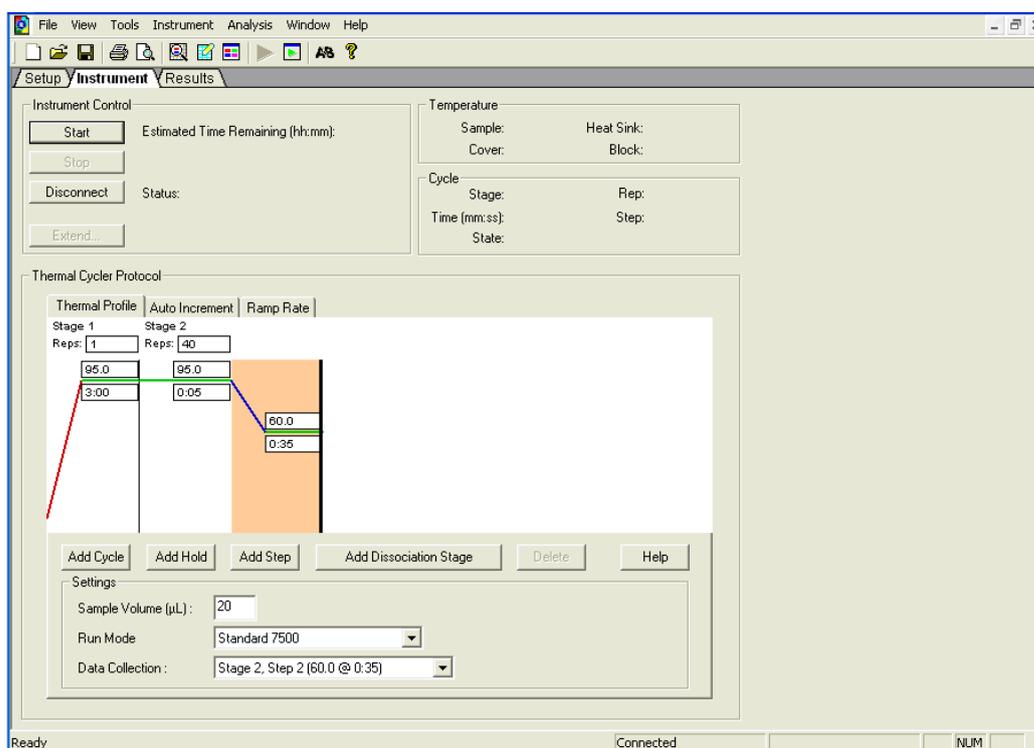
La PCR de ciclado en dos pasos requiere 40 ciclos. Cada ciclo comprende 2 pasos: a 95 °C durante 5 s (paso de desnaturalización) y a 60 °C durante 35 s (paso de *annealing*/extensión).

Tabla 17. Condiciones de ciclado para el Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Paso	Temp	Tiempo	Número de ciclos	Comentarios adicionales
Paso inicial de activación de la PCR	95 °C	3 min	–	La PCR requiere una incubación inicial a 95 °C para activar la ADN polimerasa
Ciclado de dos pasos:				
desnaturalización	95 °C	5 s	40 ciclos	
<i>annealing</i> /extensión combinada	60 °C	35 s		Realice la recogida de datos de fluorescencia

13. En el perfil térmico, borre primero el primer paso presionando “Shift” (cambio) y haciendo clic en Stage 1 (fase 1) en el paso de pausa Hold (50 °C durante 2 min). Tras seleccionar el paso de pausa Hold, presione la tecla “Delete” (borrar). Cambie los tiempos de pausa a los de la tabla 17. Asegúrese de cambiar el volumen de Sample (muestra) a 20 μ l y seleccione el modo de ciclo correcto (Standard 7500).

La adquisición de datos debe realizarse durante el paso de *annealing*/extensión combinada. Si se utiliza la versión 1.2.3 del software, asegúrese de desmarcar la casilla “9600 Emulation” (emulación 9600).



Ajuste del perfil térmico (software SDS, versión 1.4).

14. Antes de ejecutar la placa de reacción, guarde el documento de placa como un archivo SDS Document (*.sds). Haga clic en “File” (archivo) y después en “Save” (guardar). Introduzca un nombre para el documento de placa y haga clic de nuevo en “Save”.
15. Cargue la placa en el instrumento.
Asegúrese de que la posición A1 de la placa está situada en el extremo superior izquierdo de la bandeja.
16. Inicie la reacción haciendo clic en “Start” (inicio).

Análisis de datos

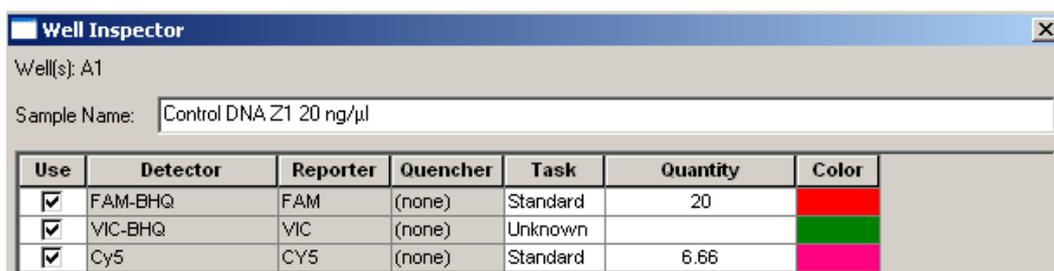
La configuración óptima del análisis es un requisito imprescindible para obtener datos exactos de cuantificación. Reajuste la configuración de análisis (es decir, la configuración de la línea de base y los valores umbral) para el análisis de cada canal de colorante indicador en cada ciclo.

Procedimiento

1. Abra el archivo del ciclo con el software SDS. Vaya a "File", después a "Open" (abrir) y a "Browse" (examinar) para localizar el archivo guardado.
2. Antes de crear una curva estándar es necesario definir los estándares. Si los estándares ya fueron definidos antes de iniciar el ciclo, siga con el paso 4.
3. Vaya a "View" (visualizar) y seleccione "Well Inspector" (inspector de pocillos) en el menú. En la columna Task, defina los pocillos que contienen los estándares de ADN para los canales FAM y Cy5 como "Standard" e introduzca la cantidad de ADN en el pocillo conforme a la Tabla 16 (página 59).

Importante: aunque no se introduzcan unidades para Quantity, es necesario utilizar una unidad común para todas las cantidades estándar (p.ej., ng/ μ l). Las unidades utilizadas para las cantidades estándar determinan las unidades de cuantificación para el análisis de los resultados.

Nota: deje la columna Task del detector VIC para reacciones estándar marcada como "Unknown". No se necesitan valores de cantidad para el control interno. Introduzca el nombre de la muestra (p. ej., Control DNA Z1 20 ng/ μ l).



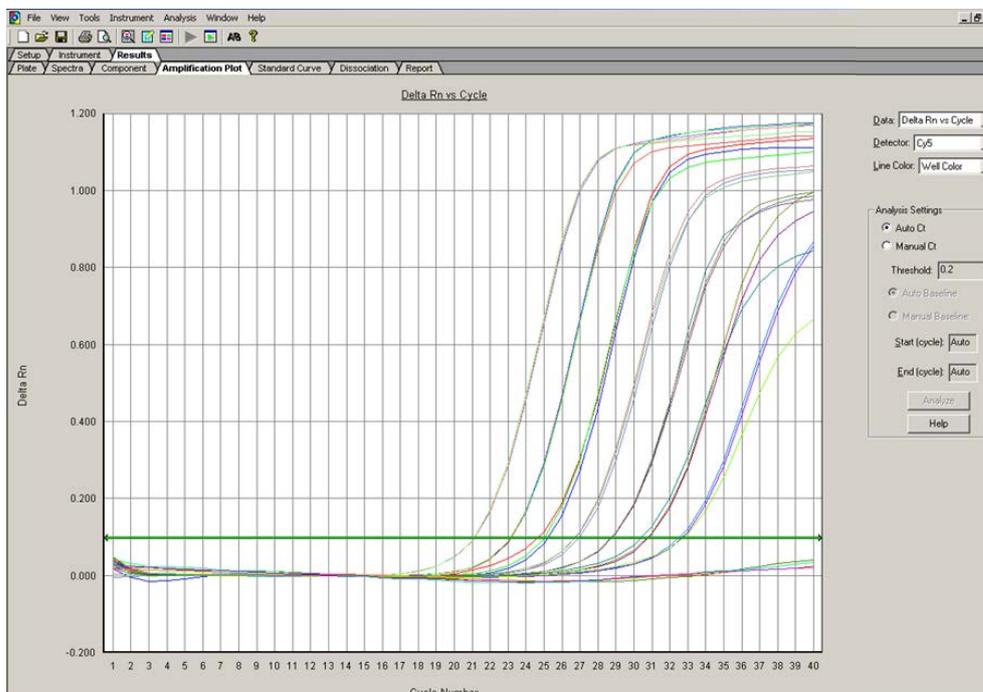
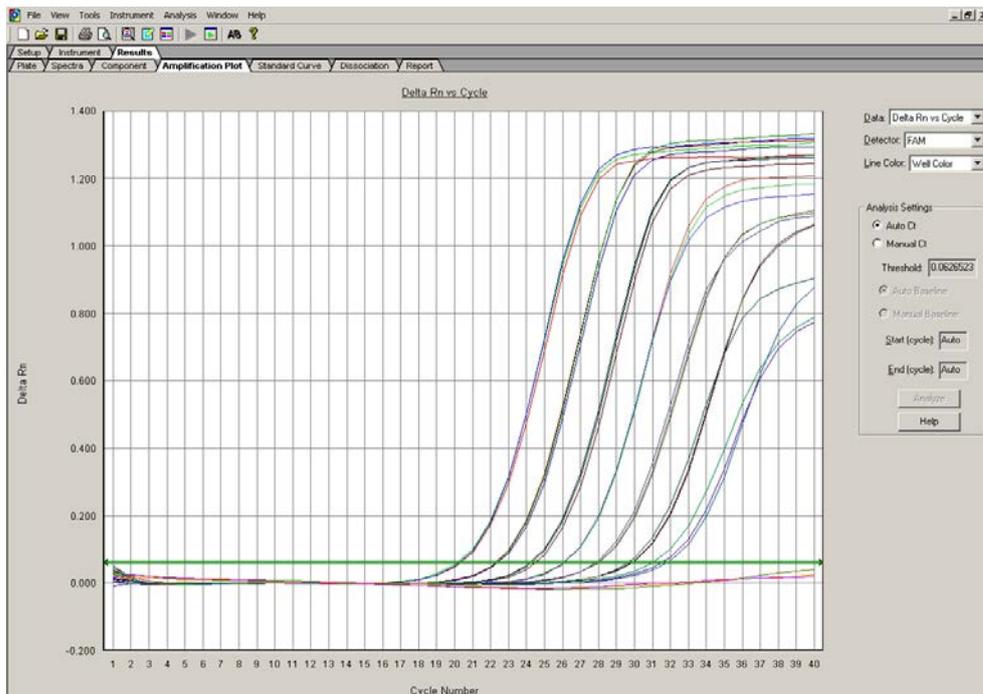
The screenshot shows the 'Well Inspector' window with the following configuration:

Use	Detector	Reporter	Quencher	Task	Quantity	Color
<input checked="" type="checkbox"/>	FAM-BHQ	FAM	(none)	Standard	20	Red
<input checked="" type="checkbox"/>	VIC-BHQ	VIC	(none)	Unknown		Green
<input checked="" type="checkbox"/>	Cy5	CY5	(none)	Standard	6.66	Magenta

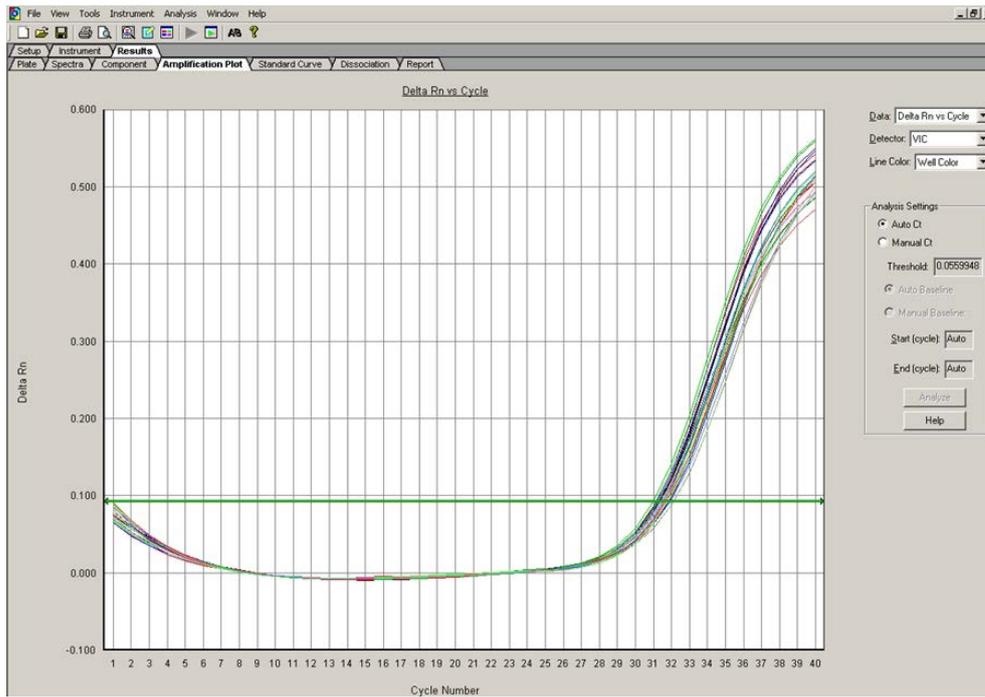
Well inspector.

4. En la pestaña "Amplification Plot" (esquema de amplificación), localizable en la pestaña "Results" (resultados), seleccione las muestras adecuadas en la tabla situada debajo del esquema de amplificación. Elija "Auto Ct" (cálculo automático) para los tres canales y presione "Analyze" (analizar).

La configuración del valor umbral adecuado puede requerir una validación interna adicional en su centro de trabajo.

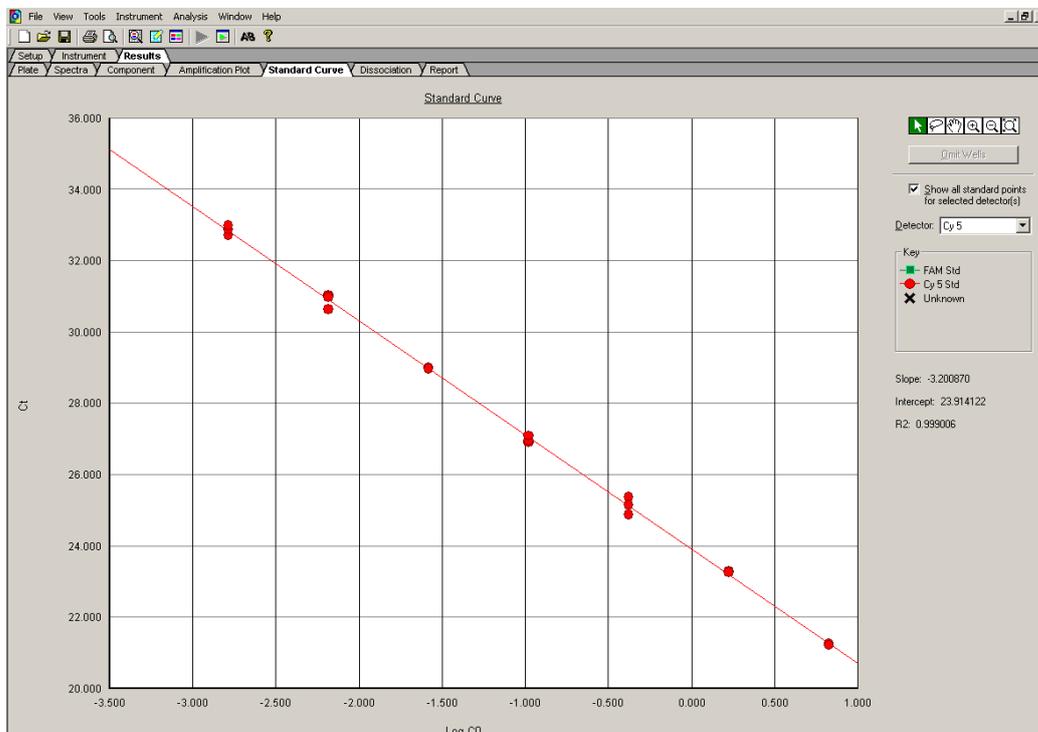
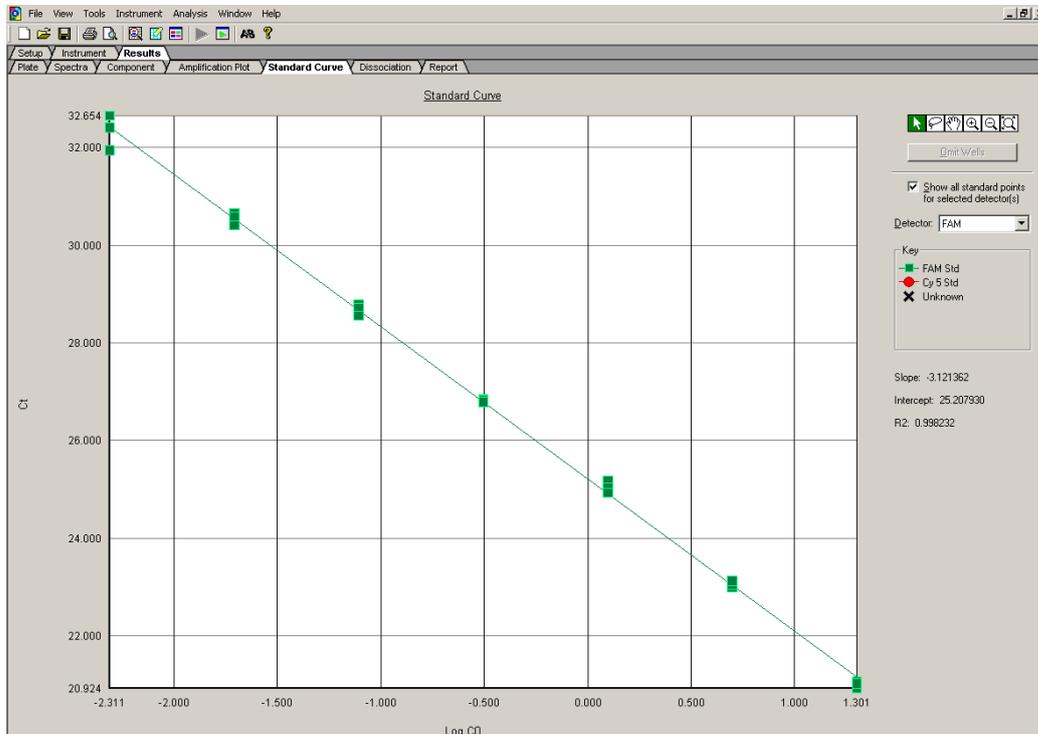


Análisis de muestras para los canales FAM y Cy5. El canal VIC se muestra en la página 64.



Análisis de muestra para el canal VIC. Los canales FAM y Cy5 se muestran en la página 63.

- Para ver las curvas estándar, seleccione la pestaña "Standard Curve" (curva estándar), localizable en la pestaña "Results". Consulte los valores C_T para las reacciones estándar de cuantificación y la línea de regresión calculada, así como los valores de pendiente, R^2 e intersección Y para los canales FAM y Cy5.



Curva estándar.

6. Vea la concentración de las muestras desconocidas

El informe muestra los datos de los pocillos seleccionados y resume la cantidad de ADN presente en las muestras desconocidas. El detector FAM muestra la cantidad de ADN humano total presente, mientras que el detector Cy5 muestra la cantidad de ADN masculino presente. La cantidad se muestra en las mismas unidades empleadas para los estándares (es decir, si se utilizó ng/μl para la definición de los estándares, las cantidades para las desconocidas se indicarán en ng/μl).

El detector VIC muestra el valor C_T para el control interno.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity
A1	Control DNA Z1 20ng/μl	FAM-BHQ	Standard	21.3585	0.0764	20
A3	Control DNA Z1 20ng/μl	FAM-BHQ	Standard	21.2504	0.0764	20
A4	Control DNA Z1 5ng/μl	FAM-BHQ	Standard	23.6389	0.00669	5
A5	Control DNA Z1 5ng/μl	FAM-BHQ	Standard	23.6483	0.00669	5
A7	Control DNA Z1 1.25ng/μl	FAM-BHQ	Standard	25.6742	0.0532	1.25
A8	Control DNA Z1 1.25ng/μl	FAM-BHQ	Standard	25.599	0.0532	1.25
A10	Control DNA Z1 0.3125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	27.2562	0.0286	0.3125
A11	Control DNA Z1 0.3125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	27.2157	0.0286	0.3125
B2	Control DNA Z1 0.078125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	29.2179	0.0478	0.078125
B3	Control DNA Z1 0.078125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	29.1503	0.0478	0.078125
B5	Control DNA Z1 0.01953125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	31.3251	0.0545	0.0195313
B6	Control DNA Z1 0.01953125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	31.4021	0.0545	0.0195313
B7	Control DNA Z1 0.0048828125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	33.3229	0.228	0.00488281
B9	Control DNA Z1 0.0048828125ng/μl	FAM-BHQ	Standard	33	0.228	0.00488281
B10		FAM-BHQ	NTC	Undet.		
B11		FAM-BHQ	NTC	Undet.		
B12		FAM-BHQ	NTC	Undet.		
C1		FAM-BHQ	Unknown	26.9863		0.408069
C3		FAM-BHQ	Unknown	26.6452		0.520156
C5		FAM-BHQ	Unknown	25.9893		0.829481
C7		FAM-BHQ	Unknown	27.7887		0.230583
C9		FAM-BHQ	Unknown	25.6465		1.05859

Concentración de muestra desconocida.

- Para exportar y guardar el informe de resultados, vaya a "File", después a "Export" (exportar) y finalmente a "Results". Es necesario guardar la configuración de análisis primero para después guardar los resultados en el formato "Results Export Files *.csv".
- Para interpretar los resultados, véase "Interpretación de resultados" en la página 67.

Interpretación de los resultados

Consideraciones generales para el análisis de datos

Los datos de la PCR en tiempo real se muestran en esquemas de amplificación de forma sigmoidea (cuando se emplea una escala lineal), en los que la fluorescencia se mide en función del número de ciclos.

El ciclo umbral (valor C_T) sirve como herramienta de cálculo de la cantidad inicial de plantilla en cada muestra. Éste es el ciclo en el que se detecta el primer aumento significativo de la fluorescencia.

La configuración del umbral óptima depende de los productos químicos de reacción empleados para la PCR. Por lo tanto, una configuración del umbral óptima determinada para otro kit quizá no sea adecuada para el kit Investigator Quantiplex HYres y necesite ser ajustada.

Para la cuantificación de ADN con el kit Investigator Quantiplex HYres, la configuración de análisis debe ajustarse para ambos colorantes indicadores.

Curva estándar

La curva estándar es el mejor ajuste para una regresión lineal hasta los datos de las series de dilución estándar. La ecuación tiene la siguiente forma:

$$y = mx + b$$

donde x = concentración logarítmica e $y = C_T$.

La pendiente

La pendiente (m) describe la eficacia de la PCR. Una pendiente de $-3,3$ indica un 100% de eficacia de la PCR (es decir, el número de copias del producto de amplificación se duplica en cada ciclo). Normalmente, la pendiente oscila entre $-3,0$ y $-3,6$. Si los valores son superiores o inferiores, consulte la Guía de resolución de problemas en la página 70 para más información.

La intersección Y

La intersección Y (b) indica el valor C_T previsto para una muestra con Q_{ty} (cantidad) = 1 (por ejemplo, 1 ng/ μ l).

El valor R^2

El valor R^2 es una medida del ajuste de los puntos de datos hasta la línea de regresión. En general, la curva estándar tiene un valor $R^2 \geq 0,990$. Los valores R^2 bajos ($R^2 \leq 0,98$) pueden deberse a diferentes motivos. En el caso de valores R^2 bajos, consulte la Guía de resolución de problemas en la página 70 para más información.

Control interno

El control interno (IC) tiene como objetivo informar de fallos de los instrumentos o los productos químicos, de errores en la configuración del ensayo y de la presencia de inhibidores en la muestra. El sistema está diseñado para resultar más sensible a la inhibición que la diana específica para el ADN humano. Por tanto, la cuantificación será válida incluso si hay algún inhibidor en la muestra. En este caso, el operador obtendrá la información sobre la concentración de ADN en la muestra y sobre la presencia de inhibidores. La comparación del valor C_T del sistema de IC para estándares de ADN con los valores C_T del sistema de IC para muestras desconocidas puede indicar la inhibición potencial. Con concentraciones mayores de inhibidor, los datos de cuantificación pueden verse afectados, lo que debe tenerse en cuenta para aplicaciones posteriores.

La amplificación positiva del sistema de IC generará un valor C_T de aproximadamente 31 (específico del ciclador). El sistema de control interno es un sistema muy sensible para permitir la indicación de inhibidores, por lo que puede esperarse una variación de 1 C_T en las muestras de curva estándar. El uso de altos niveles de ADN humano (> 150 ng/reacción) puede dar un valor C_T más alto para el sistema de IC.

El resultado del IC debe interpretarse según el contexto del resultado de la diana específica para ADN humano. Pueden producirse las situaciones descritas en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados potenciales de la amplificación y su interpretación

Diana humana específica	Control interno	Interpretación
Sin amplificación	Amplificación positiva	No se detecta ADN humano
Sin amplificación	Sin amplificación	Resultado no válido
Amplificación positiva con bajo C_T y señal de fluorescencia alta	Sin amplificación o con C_T superior a 32	Resultado no concluyente del IC
Amplificación positiva con alto C_T y señal de fluorescencia baja	Sin amplificación o con C_T superior a 32	Presencia de inhibición en la PCR

Debe realizarse una validación interna de laboratorio con inhibidores relevantes para determinar los criterios de detección de la inhibición.

Cuantificación de muestras desconocidas

El kit Investigator Quantiplex HYres puede cuantificar un amplio rango de cantidades de ADN en una muestra: desde 75 ng/ μ l hasta cerca de 0,5 pg/ μ l con un rango altamente lineal de entre 20 ng/ μ l y 4,9 pg/ μ l de ADN genómico humano. Cuando se cargan en una reacción 2 μ l de una muestra a una concentración muy baja, el pocillo contiene aproximadamente 1–1,5 equivalentes de genoma humano diploide. En el rango de baja concentración de ADN, determinados efectos estadísticos conocidos como variaciones estocásticas pueden afectar significativamente al resultado del ensayo. Cuando utilice muestras con bajas concentraciones de ADN, asegúrese de que intervienen en el ensayo tantas réplicas como sea posible para poder confirmar el resultado.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para más información, consulte también la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions, FAQ) de nuestro Centro de Soporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN responderán siempre encantados a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular (véase la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señal o una o más señales detectadas de forma tardía en la PCR

- | | |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Condiciones de ciclado incorrectas | Adopte siempre las condiciones optimizadas de ciclado especificadas en los protocolos. Asegúrese de seleccionar ROX como colorante pasivo en los instrumentos Applied Biosystems. |
| b) Error de pipeteado, reactivo ausente o degradado. | Compruebe las condiciones de conservación de los reactivos. Repita el ensayo. |
| c) Paso de detección incorrecto o ausente | Asegúrese de que la detección de fluorescencia tiene lugar durante el paso de <i>annealing</i> /extensión combinada. |
| d) Cantidad insuficiente de plantilla inicial | Si es posible, aumente la cantidad de plantilla. Asegúrese de que hay suficientes copias del ADN de plantilla en la muestra. |
| e) Problemas con la plantilla inicial | Compruebe las condiciones de conservación del ADN de plantilla inicial.

La eliminación eficaz de los inhibidores de la PCR es esencial para obtener resultados óptimos. Purifique los ácidos nucleicos de su muestra mediante un método de purificación adecuado. Asegúrese de que todos los reactivos, tampones y soluciones empleados para aislar y diluir los ácidos nucleicos de plantilla estén libres de nucleasas. |

Comentarios y sugerencias

- f) Elección errónea del filtro/canal de detección Asegúrese de que está activado el canal de detección correcto o que el juego de filtros escogidos es el correcto para cada colorante indicador. Asegúrese de que la combinación escogida de colorantes indicadores es compatible con los canales de detección o los juegos de filtros seleccionados.
- g) Control de ADN degradado Realice nuevas diluciones en serie del ADN de control con la solución de partida. Repita el ensayo con las nuevas diluciones.

Diferencias en los valores C_T o en la eficacia de las PCR entre ciclos

- a) Condiciones de ciclado incorrectas Empiece siempre con las condiciones optimizadas de ciclado especificadas en los protocolos. Asegúrese de que las condiciones de ciclado incluyen el paso inicial de activación de la ADN-polimerasa y los tiempos especificados para la desnaturalización y el *annealing*/extensión.
- b) Configuración de análisis (es decir, configuración del umbral y de la línea de base) no óptima Compruebe la configuración de análisis (configuración del umbral y de la línea de base) para cada colorante indicador. Repita el análisis con una configuración óptima para cada colorante indicador.

Ausencia de linealidad en la proporción entre el valor C_T y el logaritmo del punto de corte de la cantidad de plantilla

- Cantidad de plantilla en muestra desconocida demasiado alta La linealidad está garantizada dentro del rango de la curva estándar. Cuando las señales aparecen en valores C_T muy tempranos, diluya la muestra y repita la reacción.

Aumento de la fluorescencia o del valor C_T para control sin plantilla

- a) Contaminación de los reactivos Deseche todos los componentes del ensayo (p.ej., la mezcla maestra).
Repita el ensayo utilizando nuevos componentes.

Comentarios y sugerencias

- b) Mínima degradación de la sonda, causante de un aumento oscilante de la fluorescencia
Compruebe los esquemas de amplificación y ajuste la configuración del umbral.
- c) Problemas de interferencia
Dependiendo del instrumento, existen diferentes técnicas para evitar la interferencia espectral al usar múltiples fluoróforos para ensayos múltiplex. Sin embargo, en los pocillos de NTC podría observarse una interferencia mínima como resultado de la superposición espectral residual, especialmente si el instrumento necesita ser calibrado.

Intensidad variable de la fluorescencia

- a) Contaminación del ciclador en tiempo real
Las reacciones se contaminaron con ADN diana. Descontamine las estaciones de trabajo en tiempo real y el ciclador conforme a las instrucciones del fabricante. Use nuevos reactivos y soluciones.
- b) Ciclador a tiempo real necesitado de calibración
Vuelva a calibrar el ciclador en tiempo real conforme a las instrucciones del fabricante.
- c) Curva ondulada ante altas cantidades de plantilla para dianas muy concentradas
En la configuración de análisis, reduzca el número de ciclos empleados para el cálculo de la señal de ruido (si el ciclador en tiempo real lo permite) o reduzca la cantidad de plantilla.

La pendiente de la curva estándar difiere significativamente de $-3,33$ o el valor R^2 es significativamente inferior a $0,98-0,99$.

- a) Contaminación del ciclador en tiempo real
Descontamine el ciclador en tiempo real conforme a las instrucciones del fabricante.
- b) Ciclador a tiempo real y/o pipetas necesitadas de calibración
Vuelva a calibrar el ciclador en tiempo real conforme a las instrucciones del fabricante.
Calibre las pipetas para minimizar la variabilidad de pipeteado.

Comentarios y sugerencias

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| c) Curva ondulada ante altas cantidades de plantilla para dianas muy concentradas | En la configuración de análisis, reduzca el número de ciclos empleados para el cálculo de la señal de ruido o reduzca la cantidad de plantilla. |
| d) Problema con la dilución de estándares | <p>Asegúrese de que el estándar de ADN está completamente descongelado y mezclado meticulosamente antes de su uso.</p> <p>Asegúrese de que las diluciones del estándar de ADN están mezcladas meticulosamente antes de retirar cada cantidad alícuota para la dilución en serie.</p> <p>No utilice un volumen de muestra distinto a 2 μl.</p> <p>Cambie las puntas de las pipetas entre cada paso de la dilución.</p> |
| e) La placa no estaba sellada | Selle cuidadosamente las placas para evitar la evaporación. |
| f) Se produjo un error durante la dilución del estándar de ADN | Compruebe todos los cálculos y repita la dilución del estándar de ADN. |
| g) Se introdujeron valores de concentración incorrectos en el software | Compruebe las concentraciones de todas las muestras utilizadas para generar la curva estándar. |
| h) Fluorescencia anormal | No escriba en la placa. Manipule las placas con cuidado. Use guantes. |
| i) Variación estadística | Cierta variación en la reacción es normal, especialmente con la presencia de la diana de ADN en un número bajo de copias. Realice al menos duplicados de la curva estándar con el fin de minimizar el efecto de esta variación. Retire la dilución de 0,0048828125 ng/ μ l del estándar de ADN de la curva estándar cambiando el tipo de muestra a "Unknown". |

Bibliografía

QIAGEN mantiene online una extensa base de datos actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica online de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

Referencias citadas

Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T. and Little, S. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **17**, 804.

Información para pedidos

Producto	Contenido	Nº de referencia
Investigator Quantiplex HYres Kit (200)	Mezcla de cebador, mezcla de reacción, Control DNA (ADN de control) y TE Buffer (tampón de dilución TE)	387116
Kits relacionados		
Investigator Quantiplex Kit (200)	Mezcla de cebador, mezcla de reacción, Control DNA (ADN de control) y Dilution Buffer (tampón de dilución)	387016
Investigator DIPplex Kit (25)	Mezcla de cebador, mezcla de reacción, DNA Polymerase (ADN polimerasa), Control DNA (ADN de control), escalera alélica, estándar de tamaño de ADN y agua libre de nucleasas	384013
Investigator DIPplex Kit (100)	Mezcla de cebador, mezcla de reacción, DNA Polymerase (ADN polimerasa), Control DNA (ADN de control), escalera alélica, estándar de tamaño de ADN y agua libre de nucleasas	384015
Software de análisis		
Investigator IDproof Software	Paquete de software en CD incluidos archivos de instalación para las versiones Desktop (escritorio), Server (servidor) y Client (cliente) del software IDproof	9020775
Investigator IDproof Demo Key	Uso gratuito de la versión Desktop (escritorio) del software IDproof durante los 30 días siguientes a su instalación	389001
Investigator IDproof Single Key	Permite el uso ilimitado de la versión Desktop (escritorio) del software; instalación en una única estación de trabajo con una base de datos local	389002
Investigator IDproof Server Key	Permite la configuración de un servidor que mantenga la base de datos y el acceso a la base de datos a través de diversas estaciones de trabajo. Debe adquirirse junto con la Client Key (clave cliente)	389003

Producto	Contenido	Nº de referencia
Investigator IDproof Client Key	Debe adquirirse junto con la Server Key (clave servidor)	389004
Investigator IDproof Mixture Software	Paquete de software en CD incluidos archivos de instalación para las versiones Desktop (escritorio), Server (servidor) y Client (cliente) del software IDproof Mixture	9020777
Investigator IDproof Mixture Demo Key	Uso gratuito de la versión Desktop (escritorio) del software IDproof Mixture durante los 30 días siguientes a su instalación	389401
Investigator IDproof Mixture Single Key	Permite el uso ilimitado de la versión Desktop (escritorio) del software; instalación en una única estación de trabajo con una base de datos local	389402
Investigator IDproof Mixture Server Key	Permite la configuración de un servidor que mantenga la base de datos y el acceso a la base de datos a través de diversas estaciones de trabajo. Debe adquirirse junto con la Client Key (clave cliente)	389403
Investigator IDproof Mixture Client Key	Debe adquirirse junto con la Server Key (clave servidor)	389404

Producto	Contenido	Nº de referencia
Extracción y purificación de ADN		
QIAamp® DNA Investigator Kit (50)	50 QIAamp MinElute® Columns (columnas QIAamp MinElute), Proteinase K (proteínasa K), Carrier RNA (ARN transportador), Buffers (tampones), Collection Tubes (tubos de recogida, 2 ml)	56504
EZ1® DNA Investigator Kit (48)	Reagent Cartridges (cartuchos de reactivo DNA Investigator), Disposable Filter-Tips (puntas con filtro desechables), Disposable Tip-Holders (portapuntas desechables), Sample Tubes (tubos de muestra, 2 ml), Elution Tubes (tubos de elución, 1,5 ml), G2 Buffer (tampón G2), Proteinase K (proteínasa K), Carrier RNA (ARN transportador)	952034
MinElute Reaction Cleanup Kit (50)*	50 MinElute Spin Columns (columnas de centrifugado MinElute), Buffers (tampones), Collection Tubes (tubos de recogida, 2 ml)	28004
Rotor-Gene Q		
Rotor-Gene Q 2plex	Ciclador para PCR en tiempo real con dos canales, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía para piezas y mano de obra	Consultar
Rotor-Gene Q 2plex HRM	Ciclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución (High Resolution Melt) con dos canales más canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía para piezas y mano de obra	Consultar
Rotor-Gene Q 5plex	Ciclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía para piezas y mano de obra	Consultar

Producto	Contenido	Nº de referencia
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Ciclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución (High Resolution Melt) con 5 canales más canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía para piezas y mano de obra	Consultar
Rotor-Gene Q 6plex	Ciclador para PCR en tiempo real con 6 canales, ordenador portátil, software, accesorios, 1 año de garantía para piezas y mano de obra	Consultar

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía de usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías de usuario de los kits QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Notas

Notas

Notas

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAgility®, Investigator®, MinElute®, Q-Bond®, QuantiTect®, Rotor-Gene®, Scorpions®, 4NS1C® (QIAGEN Group); Applied Biosystems®, FAM™, VIC® (Applied Biosystems o sus subsidiarios); Cy™ (GE Healthcare); Excel® (Microsoft Corporation); Yakima Yellow® (Epoch). Incluso en aquellos casos en los que no se indica de manera explícita, no debe asumirse que las marcas comerciales, nombres registrados, etc., no están protegidos por la ley.

Acuerdo de licencia limitada para el kit Investigator Quantiplex HYres

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

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido suministrados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. Estos protocolos no han sido rigurosamente comprobados ni optimizados por QIAGEN. QIAGEN no los garantiza ni ofrece garantías de que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinja(n) los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda 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 del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, 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 sus componentes.

Este Producto se vende bajo un acuerdo de licencia con Epoch para su uso exclusivo en los campos de diagnóstico in vitro (DIV) y biología aplicada y no puede utilizarse para cualquier otro tipo de investigación comercial o clínica o para cualquier otro uso fuera de sus campos de aplicación.

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

© 2012 QIAGEN, todos los derechos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

