



Mai 2026

Investigator[®] 24plex GO! Manuel du kit

Pour l'amplification Multiplex des loci de base du CODIS, de l'ensemble européen de référence des loci, des loci SE33, DYS391 et de l'amélogénine

Table des matières

Contenu du kit	4
Transport et conservation	5
Utilisation prévue	6
Informations de sécurité	7
Contrôle de la qualité	8
Introduction	9
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	12
Tous les protocoles	12
Pour les protocoles basés sur les cellules sanguines ou buccales sur papier	13
Pour les protocoles basés sur les lysats sur écouvillons buccaux	13
Logiciel d'analyse de validité des produits d'identification humaine	14
Remarques importantes	15
Protocole : amplification par PCR à partir de sang sur papier FTA et autres types de papier	16
Points importants avant de commencer	16
À faire avant de commencer	16
Procédure	16
Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur papier FTA et autres papiers	20
Points importants avant de commencer	20
À faire avant de commencer	20
Procédure	20
Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales des Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode)	25
Points importants avant de commencer	25
À faire avant de commencer	25
Procédure	25
Protocole : amplification par PCR à partir de lysats d'écouvillons buccaux	30
Points importants avant de commencer	30
À faire avant de commencer	30
Procédure	30

Protocole : électrophorèse à l'aide de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer	34
Étalonnage spectral ou génération de matrice	35
Préparation des échantillons	42
Configuration d'un cycle	43
Démarrage du cycle d'exécution	48
Paramètres et méthode d'analyse	50
Protocole : analyse	51
Logiciel d'analyse	51
Témoins	52
Capteur qualité	54
Allèles	57
Guide de résolution de problèmes	61
Références	65
Annexe A : interprétation des résultats	66
Procédure générale d'analyse	66
Pics de remontée	66
Pics de stutter	66
Addition nucléotidique indépendante du modèle	67
Interférences	67
Annexe B : Variation des volumes de PCR à l'aide de Investigator 24plex GO! Kit	68
Sang ou cellules buccales sur papier FTA ou autre papier	68
Lysats sur écouvillons buccaux	68
Informations sur les commandes	69
Historique des révisions du document	72

Contenu du kit

Investigator 24plex GO! Kit Numéro de référence N°. de réactions de 25 µl	(200) 382426 200	(1000) 382428 1000
Fast Reaction Mix 2.0 (mélange à réaction rapide 2.0)*	2 x 750 µl	10 x 750 µl
Primer Mix 24plex GO! (mélange d'amorces 24 plex GO!)	2 x 1 250 µl	10 x 1 250 µl
Control DNA 9948 (ADN de contrôle 9948) (5 ng/µl)	50 µl	50 µl
DNA Size Standard 24plex (taille standard d'ADN 24plex) (BTO)	110 µl	5 x 110 µl
Allelic Ladder 24plex (échelle allélique 24 plex)	2 x 25 µl	6 x 25 µl
Quick-Start ProtocolP (protocole de démarrage rapide)	1	1

* Contient de l'ADN polymérase, des dNTP, du MgCl₂ et de l'albumine sérique bovine (BSA).

Transport et conservation

Le Investigator 24plex GO! Kit est expédié sous carboglace. Dès réception, le conserver entre -30°C et -15°C dans un congélateur à température constante. Éviter les congélations et décongélations répétées. Le mélange d'amorces et l'échelle allélique doivent être conservés à l'abri de la lumière. Stocker les échantillons d'ADN et les réactifs post-PCR (échelle allélique et taille standard d'ADN) séparément des réactifs PCR. Dans ces conditions, les composants sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation figurant sur le kit.

Une fois ouvert, le Investigator 24plex GO! Kit doit être conservé entre 2 et 8°C pendant une durée maximale de 6 mois.

Utilisation prévue

Le Investigator 24plex GO! Kit est destiné à des applications de biologie moléculaire dans le cadre d'analyses médico-légales, de tests d'identification humaine et de tests de paternité. Ce produit n'est pas conçu pour le diagnostic, la prévention ou le traitement des maladies.

Les produits doivent être manipulés avec le plus grand soin et la plus grande attention. Nous recommandons à tous les utilisateurs des produits QIAGEN® de respecter les directives du NIH (National Institutes of Health) mises en place pour les expériences d'ADN recombinant ou d'autres directives applicables.

Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veiller à consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF, pratique et compact, à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de retrouver, consulter et imprimer la FDS de chaque kit et composant QIAGEN.

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du Investigator 24plex GO! Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Les kits Investigator 24plex GO! répondent aux exigences de la norme ISO 18385.

Introduction

Le Investigator 24plex GO! Kit est utilisé pour la PCR multiplex dans les tests de médecine légale, d'identification humaine et de paternité. La PCR amplifie simultanément les 22 marqueurs microsatellites (STR) polymorphes répertoriés ci-dessous ainsi que l'amélogénine déterminant le sexe. Ces 22 marqueurs sont recommandés par le groupe de travail sur les loci de base du système CODIS (Combined DNA Index System), par l'ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) et l'EDNAP (European DNA Profiling Group).

Le mélange d'amorces Investigator 24plex GO! Kit contient deux contrôles PCR internes innovants (capteur qualité QS1 et QS2) pour fournir des informations utiles sur l'efficacité de la PCR et la présence d'inhibiteurs de PCR. Les capteurs qualité sont amplifiés simultanément avec les marqueurs STR polymorphes.

Le Investigator 24plex GO! Kit a été conçu spécifiquement pour une amplification directe rapide à partir de sang ou de cellules buccales sur papier FTA® et autres papiers, ainsi que sur des écouvillons buccaux. Le kit utilise la technologie de PCR à cycle rapide de QIAGEN, permettant une amplification en environ 45 minutes. Les prélèvements effectués sur papier FTA et d'autres papiers filtres peuvent être utilisés sans prétraitement. Pour les écouvillons buccaux, un protocole de lyse rapide et adapté génère un lysat brut pour l'amplification en 5 minutes environ. Les amorces sont marquées par fluorescence avec les colorants suivants :

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

La quantité d'échantillon recommandée est une pastille de 1,2 mm de diamètre pour les papiers FTA et autres papiers filtres, ou 2 µl de lysat d'écouvillon buccal.

Le Investigator 24plex GO! Kit a été validé à l'aide du GeneAmp® PCR System 9700 (avec bloc de 96 puits en argent plaqué or) et de l'Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer.

Le Tableau 1 indique les loci des marqueurs STR avec leur carte chromosomique et les motifs répétés, qui sont conformes aux recommandations de l'ISFG (International Society for Forensic Genetics) sur l'utilisation des marqueurs microsatellites (1).

Pour plus d'informations sur les microvariants connus ne figurant pas dans l'échelle allélique Investigator 24plex, consultez le site Web du National Institute of Standards and Technology (NIST) (Institut national des normes et de la technologie) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Tableau 1. Informations spécifiques au locus du Investigator 24plex GO! Kit

Locus	Numéro d'enregistrement GenBank®	Motif répété de l'allèle de référence	Carte chromosomique
Amélogénine X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amélogénine Y	M55419	–	Yp11.2
DYS391	AC011302	[TCTA] ₁₁	Yq11.21
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] ₁₆ [TGA][TAGA][TAGG] ₁ [TG] ₅	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] ₁₂	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	3p25.3
D5S818	G08446	[AGAT] ₁₁	5q23.2
D7S820	G08616	[GATA] ₁₂	7q21.11

Tableau 1. Informations spécifiques au locus du Investigator 24plex GO! Kit (suite)

Locus	Numéro d'enregistrement GenBank®	Motif répété de l'allèle de référence	Carte chromosomique
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] ₁₃	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	12p13.2
D13S317	G09017	[TATC] ₁₃	13q31.1
D16S539	G07925	[GATA] ₁₁	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] ₁₁	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	22q12.3
CSF1PO	X14720	[AGAT] ₁₂	5q33.1
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
TPOX	M68651	[AATG] ₁₁	2p25.3
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation de produits chimiques, porter systématiquement un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) correspondantes disponibles auprès du fournisseur du produit.

Tous les protocoles

- Hi-Di™ Formamide, 25 ml (Applied Biosystems, réf. n°. 4311320)
- Matrix Standards BT6 pour instruments multicapillaires (p. ex. 3500 Genetic Analyzers)
- Pipettes et embouts de pipettes
- L'un des analyseurs d'ADN suivants* :
 - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- L'un des thermocycleurs de PCR suivants* :
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
 - VeritiPro™ Thermal Cycler
 - ProFlex™ 96-well PCR System
 - Bio-Rad® PTC-200

* Cette liste de fournisseurs n'est pas exhaustive et ne comprend pas de nombreux fournisseurs importants de matériel biologique.

- Biometra™ UNO-Thermoblock
- Eppendorf® Mastercycler® ep
- Tubes ou plaques de PCR
- Microcentrifugeuse pour tubes ou plaques de PCR

Pour les protocoles basés sur les cellules sanguines ou buccales sur papier

- UniCore Punch Kit 1,2 mm (cat. n°. WB100028) et Cutting Mat, 15,2 x 20,3 cm (réf. n°. WB100020)
- Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) or (200) (réf. n°. 386528 ou 386526, respectivement)
- Investigator STR GO! Lysis Buffer (réf. n°. 386516)

Remarque : ceci concerne uniquement le Bode Buccal DNA Collector (dispositif de prélèvement d'ADN buccal Bode) et, éventuellement, les cellules buccales conservées à long terme sur des cartes FTA.

Pour les protocoles basés sur les lysats sur écouvillons buccaux

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (réf. n°. 386516)
- Tubes de microcentrifugation de 2 mL
- Agitateur pour tubes de microcentrifugation de 2 mL

Logiciel d'analyse de validité des produits d'identification humaine

Les kits de PCR pour identification humaine Investigator nécessitent un étalonnage avec une échelle allélique. Par conséquent, le logiciel utilisé doit être compatible avec les produits d'identification humaine destinés à des applications médico-légales. Nous recommandons le logiciel GeneMapper® ID-X. Les fichiers de modèles Investigator facilitent l'analyse des données et sont compatibles avec ce logiciel.

Remarques importantes

Les conditions expérimentales décrites dans les protocoles permettent d'obtenir les meilleurs résultats. Pour autant, selon le type d'échantillon, le nombre de cycles de PCR peut être adapté afin de garantir le taux de réussite le plus élevé possible dès le premier test. Nous vous recommandons de tester un lot d'échantillons représentatifs pour confirmer que le nombre de cycles de ce protocole est optimal. Augmenter le nombre de cycles de un si les signaux sur les électrophérogrammes obtenus sont trop faibles. Diminuer le nombre de cycles de un si les signaux sur les électrophérogrammes obtenus sont trop élevés.

Protocole : amplification par PCR à partir de sang sur papier FTA et autres types de papier

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR à partir de prélèvements de sang sur papier FTA et autres types de papier à l'aide du Investigator 24plex GO! Kit.

Points importants avant de commencer

- Préparer tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour l'extraction d'ADN et l'analyse du produit de PCR (post-PCR).
- Utiliser des embouts jetables munis de filtres hydrophobes afin de minimiser le risque de contamination croisée.

À faire avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes contenant les composants de la PCR, agiter au vortex puis centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.

Procédure

1. Prélever un disque de 1,2 mm au centre de la tache de sang avec un outil adapté (p. ex. UniCore Punch Kit 1,2 mm [Kit d'emporte-pièce UniCore 1,2 mm], réf. n°. WB100028).

Important : n'utiliser qu'un seul disque à la fois.

2. Préparer un mélange maître conformément à Tableau 2 sur la page en regard. Le mélange maître contient tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception de l'ADN matrice (échantillon).

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparer le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif.

Tableau 2. Configuration du mélange maître

Composant	Volume (µl) par réaction
Mélange à réaction rapide 2.0	7,5
Mélange d'amorces	12,5
Volume total	20,0

Remarque : si des échantillons de sang sur papier FTA ont été conservés pendant des périodes prolongées, nous recommandons l'Investigator STR GO! Punch Buffer pour corriger l'éventuelle inhibition. Ajouter 3 µl d'Investigator STR GO! Punch Buffer par réaction.

3. Vortexer soigneusement le mélange réactionnel et en distribuer 20 µl (ou 23 µl, si l'Investigator STR GO! Punch Buffer, réf. n°. 386526 ou 386528, est utilisé) dans les tubes PCR ou les puits d'une plaque PCR.
4. Transférer un disque de 1,2 mm à chaque réaction.

Remarque : ne pas mélanger le mélange réactionnel après le transfert du disque.

5. Préparer les contrôles positif et négatif.

- **Contrôle positif :** utiliser 2 µl d'ADN de contrôle (c.-à-d. 10 ng).

Remarque : il peut être nécessaire d'adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein du laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. Ne pas ajouter de disque vierge au puits de contrôle positif.

- **Contrôle négatif :** ne pas ajouter d'ADN matriciel. Ne pas ajouter de disque vierge ni d'eau dans le tube ou le puits de PCR du contrôle négatif.

6. Centrifuger brièvement les mélanges réactionnels afin que les disques soient entièrement immergés.
7. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en utilisant les conditions figurant dans Tableau 3a sur la page en regard ou Tableau 3b sur la page en regard.

Remarque : en cas d'utilisation du GeneAmp PCR System 9700 avec un bloc en aluminium, sélectionner « **Std Mode** » (mode standard) ; en cas d'utilisation d'un bloc en argent ou d'un bloc en argent plaqué or, sélectionner « **Max Mode** » (mode maximal). Ne pas sélectionner « **9600 Emulation Mode** » (mode d'émulation 9600).

Remarque : pour les thermocycleurs présentant des vitesses de montée en température plus élevées (par exemple, le VeritiPro Thermal Cycler), régler les vitesses de montée à 4 °C/s. Sinon, si le thermocycleur propose un mode d'émulation, l'activer et sélectionner un thermocycleur figurant dans le rapport de validation.

Une fois le protocole de cycle terminé, stocker les échantillons entre –30 °C et –15 °C à l'abri de la lumière ou passer directement à l'électrophorèse.

Tableau 3a. Protocole de cycles standard pour le sang sur papier FTA et autres supports papier

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	3
64	40 s	
72	5 s	
96	10 s	22
61	40 s	
72	5 s	
68	5 min	–
60	5 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 3b. Protocole de cycle en option pour le sang sur applicateur FTA et autre papier

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	3
64	40 s	
72	5 s	
96	10 s	22
61	40 s	
72	5 s	
68	2 min	–
60	2 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 3b détaille les conditions de cycle publiées précédemment qui peuvent continuer à être utilisées si aucune adénylation incomplète n'est visible sur les électrophérogrammes.

Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur papier FTA et autres papiers

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR issus de prélèvements de cellules buccales sur des applicateurs FTA et autres papiers avec le kit Investigator 24plex GO! (Pour les Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode), voir « Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales des Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode) » à la page 25.)

Points importants avant de commencer

- Préparer tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour l'extraction d'ADN et l'analyse du produit de PCR (post-PCR).
- Utiliser des embouts jetables munis de filtres hydrophobes afin de minimiser le risque de contamination croisée.

À faire avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes contenant les composants de la PCR, agiter au vortex puis centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.

Procédure

1. Préparer un mélange maître conformément à Tableau 4. Le mélange maître contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparer le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif.

Tableau 4. Configuration du mélange maître

Composant	Volume (µl) par réaction
Mélange à réaction rapide 2.0	7,5
Mélange d'amorces	12,5
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0
Volume total	22,0

2. Vortexer bien la réaction.
3. Prélever un échantillon de 1,2 mm au centre de la zone de dépôt de l'échantillon avec un outil adapté (p. ex. UniCore Punch Kit 1,2 mm).

Remarque : pour les cellules buccales prélevées avec des cartes Indicating FTA Cards, effectuer le prélèvement sur une zone blanche. Cette couleur indique un transfert d'échantillon réussi.

Important : n'utiliser qu'un seul disque à la fois.

4. Préparer la PCR avec des prélèvements d'échantillon (standard ou en option).

Protocole standard

- a. Répartir 22 µl dans les tubes PCR ou dans les puits d'une plaque PCR.
- b. Transférer un disque de 1,2 mm à chaque réaction.

Remarque : ne pas mélanger le mélange réactionnel après le transfert du disque.

Protocole facultatif (par exemple, pour les cartes stockées à long terme ou pour les cartes n'ayant pas produit de résultat STR exploitable auparavant)

- a. Ajouter 5–10 µl d'Investigator STR GO! Lysis Buffer dilué dans chaque puits ou tube PCR.

Remarque : diluer l'Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer dilué au 1:5 avec de l'eau de qualité PCR. Le volume final d'Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer non dilué par PCR ne doit pas dépasser 2 µl.

- b. Transférer un punch par échantillon dans le puits ou le tube contenant le tampon de lyse dilué.
- c. Incuber pendant 15 min à 95 °C, en laissant les tubes ouverts ou la plaque de PCR découverte.

Remarque : le tampon de lyse va s'évaporer.

Remarque : laisser refroidir la plaque ou le tube PCR pendant 5 min à température ambiante (15–25 °C) avant de distribuer le mélange maître.

- d. Après l'incubation, distribuer 22 µl de mélange maître par échantillon dans chaque puits de la plaque de PCR ou dans les tubes de PCR contenant le punch de 1,2 mm.

Remarque : ne pas mélanger le mélange réactionnel après avoir distribué le mélange maître.

5. Préparer les contrôles positif et négatif.

- **Contrôle positif** : utiliser 1 µl d'ADN de contrôle (soit 5 ng) pour les échantillons de sang ou 1 µl d'ADN de contrôle pour les échantillons de cellules buccales sur papier FTA ou autre.

Remarque : il peut être nécessaire d'adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein du laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. Ne pas ajouter de disque vierge au puits de contrôle positif.

- **Contrôle négatif** : ne pas ajouter d'ADN matriciel. Ne pas ajouter de disque vierge ni d'eau dans le tube ou le puits de PCR du contrôle négatif.
6. Centrifuger brièvement les mélanges réactionnels afin que les disques soient entièrement immergés.
 7. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en utilisant les conditions figurant dans Tableau 5a ou Tableau 5b.

Remarque : en cas d'utilisation du GeneAmp PCR System 9700 avec un bloc en aluminium, sélectionner « **Std Mode** » (mode standard) ; en cas d'utilisation d'un bloc en argent ou d'un bloc en argent plaqué or, sélectionner « **Max Mode** » (mode maximal). Ne pas sélectionner « **9600 Emulation Mode** » (mode d'émulation 9600).

Remarque : pour les thermocycleurs présentant des vitesses de montée en température plus élevées (par exemple, le VeritiPro Thermal Cycler), régler les vitesses de montée à 4 °C/s. Sinon, si le thermocycleur propose un mode d'émulation, l'activer et sélectionner un thermocycleur figurant dans le rapport de validation.

Une fois le protocole de cycles terminé, conserver les échantillons entre -30 °C et -15 °C à l'abri de la lumière, ou procéder directement à l'électrophorèse.

Tableau 5a. Protocole de cyclage standard pour les cellules buccales sur papier FTA et autres supports papier

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	
64	40 s	3
72	5 s	
96	10 s	
61	40 s	23
72	5 s	
68	5 min	–
60	5 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 5b. Protocole de cyclage optionnel pour les cellules buccales sur papier FTA et autres supports papier

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	
64	40 s	3
72	5 s	
96	10 s	
61	40 s	23
72	5 s	
68	2 min	–
60	2 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 5b détaille les conditions de cycle publiées précédemment qui peuvent continuer à être utilisées si aucune adénylation incomplète n'est visible sur les électrophérogrammes.

Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales des Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode)

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR issus de prélèvements de cellules buccales sur des Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode) avec le Investigator 24plex GO! Kit.

Points importants avant de commencer

- Préparer tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour l'extraction d'ADN et l'analyse du produit de PCR (post-PCR).
- Utiliser des embouts jetables munis de filtres hydrophobes afin de minimiser le risque de contamination croisée.

À faire avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes contenant les composants de la PCR, agiter au vortex puis centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.

Procédure

1. Prélever un échantillon de 1,2 mm à l'extrémité (bout arrondi) du Bode Buccal DNA Collector (collecteur d'ADN buccal Bode) à l'aide d'un outil adapté (par exemple, le UniCore Punch Kit 1,2 mm, réf. n°. WB100028) dans une plaque de 0,2 mL de qualité PCR ou un tube de 0,2 mL de qualité PCR.

Important : n'utiliser qu'un seul prélèvement à la fois, par puits ou par tube.

- Ajouter 2 µl d'Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer (tampon de lyse du kit) directement sur l'échantillon de 1,2 mm. Centrifuger brièvement si nécessaire pour pouvoir rassembler le prélèvement et le tampon au fond de la plaque ou du tube.
- Incuber l'échantillon à 95 °C pendant 5 min. Ne pas sceller la plaque ni fermer le tube.

Remarque : le tampon de lyse va s'évaporer.

Remarque : laisser refroidir la plaque ou le tube PCR pendant 5 min à température ambiante (15–25 °C) avant de distribuer le mélange maître (étape 5).

Sinon, ou pour une préparation automatisée de la réaction, ajouter 5 à 10 µl d'Investigator STR GO! Lysis Buffer dilué dans chaque puits de PCR ou tube vide. Transférer un échantillon de 1,2 mm dans le puits ou le tube contenant le tampon de lyse dilué. Prolonger le temps d'incubation à 95 °C jusqu'à 15 min.

Remarque : diluer l'Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer dilué au 1:5 avec de l'eau de qualité PCR. Le volume final d'Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer non dilué par réaction PCR ne doit pas dépasser 2 µl.

- Préparer un mélange maître conformément à Tableau 6. Vortexer bien la réaction. Le mélange maître contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparer le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif.

Tableau 6. Configuration du mélange maître

Composant	Volume (µl) par réaction
Mélange à réaction rapide 2.0	7,5
Mélange d'amorces	12,5
Volume total	20,0

5. Après incubation, répartir 20 µl de mélange maître dans chaque puits de la plaque de PCR ou dans les tubes de PCR contenant l'échantillon de 1,2 mm.

Remarque : ne pas mélanger le mélange réactionnel après avoir distribué le mélange maître.

6. Préparer les contrôles positif et négatif.

- **Contrôle positif** : utiliser 2 µl d'ADN de contrôle (c.-à-d. 10 ng).

Remarque : il peut être nécessaire d'adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein du laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. Ne pas ajouter de disque vierge au puits de contrôle positif.

- **Contrôle négatif** : ne pas ajouter d'ADN matriciel. Ne pas ajouter de disque vierge ni d'eau dans le tube ou le puits de PCR du contrôle négatif.

7. Centrifuger brièvement les mélanges réactionnels afin que les disques soient entièrement immergés.

8. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant, en utilisant les conditions indiquées dans le Tableau 7a ou le Tableau 7b.

Remarque : en cas d'utilisation du GeneAmp PCR System 9700 avec un bloc en aluminium, sélectionner « **Std Mode** » (mode standard) ; en cas d'utilisation d'un bloc en argent ou d'un bloc en argent plaqué or, sélectionner « **Max Mode** » (mode maximal). Ne pas sélectionner « **9600 Emulation Mode** » (mode d'émulation 9600).

Remarque : pour les thermocycleurs présentant des vitesses de montée en température plus élevées (par exemple, le VeritiPro Thermal Cycler), régler les vitesses de montée à 4 °C/s. Sinon, si le thermocycleur propose un mode d'émulation, l'activer et sélectionner un thermocycleur figurant dans le rapport de validation.

Une fois le protocole de cycles terminé, conserver les échantillons entre -30 °C et -15 °C à l'abri de la lumière, ou procéder directement à l'électrophorèse.

Tableau 7a. Protocole de cycles standard pour les cellules buccales sur les Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode)

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	
64	40 s	3
72	5 s	
96	10 s	
61	40 s	24
72	5 s	
68	5 min	–
60	5 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 7b. Protocole de cyclage facultatif pour les cellules buccales sur les Bode Buccal DNA Collectors (collecteurs d'ADN buccal Bode)

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	
64	40 s	3
72	5 s	
96	10 s	
61	40 s	24
72	5 s	
68	2 min	–
60	2 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 7b détaille les conditions de cycle publiées précédemment qui peuvent continuer à être utilisées si aucune adénylation incomplète n'est visible sur les électrophérogrammes.

Protocole : amplification par PCR à partir de lysats d'écouillons buccaux

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR issus de lysats bruts d'écouillons buccaux avec le Investigator 24plex GO! Kit.

Points importants avant de commencer

- Préparer tous les mélanges réactionnels dans une zone séparée de celle utilisée pour l'extraction d'ADN et l'analyse du produit de PCR (post-PCR).
- Utiliser des embouts jetables munis de filtres hydrophobes afin de minimiser le risque de contamination croisée.

À faire avant de commencer

- Avant d'ouvrir les tubes contenant les composants de la PCR, agiter au vortex puis centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.

Procédure

1. Placer l'écouillon dans un tube de microcentrifugation de 2 mL.

Couper, casser ou désolidariser délicatement l'extrémité de l'écouillon.

Remarque : préparer un écouillon vierge comme contrôle négatif.

2. Ajouter 500 µl de STR GO! Lysis Buffer à l'échantillon.
3. Incuber à 95 °C pendant 5 min en agitant à 1200 tr/min dans un thermomixeur.

Facultatif : incuber à température ambiante pendant 5 min en agitant à 1200 tr/min dans un thermomixeur.

4. Préparer un mélange maître conformément à Tableau 8. Le mélange maître contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparer le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif.

Tableau 8. Configuration du mélange maître

Composant	Volume (µl) par réaction
Mélange à réaction rapide 2.0	7,5
Mélange d'amorces	12,5
Volume total	20,0

5. Vortexer soigneusement le mélange réactionnel et distribuer 20 µl dans les tubes de PCR ou les puits d'une plaque de PCR.
6. Mélanger soigneusement le lysat d'écouvillon et transférer 2 µl de lysat d'écouvillon directement dans chaque mélange réactionnel.
7. Préparer les contrôles positif et négatif.

- **Contrôle positif** : utiliser 1 µl d'ADN de contrôle (soit 5 ng).

Remarque : il peut être nécessaire d'adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein du laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. Ne pas ajouter de disque vierge au puits de contrôle positif.

- **Contrôle négatif** : utiliser un lysat d'écouvillon vierge.

8. Programmer le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant, en utilisant les conditions indiquées dans le Tableau 9a ou le Tableau 9b.

Remarque : en cas d'utilisation du GeneAmp PCR System 9700 avec un bloc en aluminium, sélectionner « **Std Mode** » (mode standard) ; en cas d'utilisation d'un bloc en argent ou d'un bloc en argent plaqué or, sélectionner « **Max Mode** » (mode maximal). Ne pas sélectionner « **9600 Emulation Mode** » (mode d'émulation 9600).

Remarque : pour les thermocycleurs présentant des vitesses de montée en température plus élevées (par exemple, le VeritiPro Thermal Cycler), régler les vitesses de montée à 4 °C/s. Sinon, si le thermocycleur propose un mode d'émulation, l'activer et sélectionner un thermocycleur figurant dans le rapport de validation.

Une fois le protocole de cycles terminé, conserver les échantillons entre -30 °C et -15 °C à l'abri de la lumière ou procéder directement à l'électrophorèse.

Tableau 9a. Protocole de cycles standard pour les lysats d'écouvillons buccaux

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	3
64	40 s	
72	5 s	
96	10 s	24
61	40 s	
72	5 s	
68	5 min	–
60	5 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 9b. Protocole de cycle en option pour les lysats sur écouvillons buccaux

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
98*	30 s	3
64	40 s	
72	5 s	
96	10 s	24
61	40 s	
72	5 s	
68	2 min	–
60	2 min	–
10	∞	–

* Démarrage à chaud pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 9b détaille les conditions de cycle publiées précédemment qui peuvent continuer à être utilisées si aucune adénylation incomplète n'est visible sur les électrophérogrammes.

Protocole : électrophorèse à l'aide de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Le Investigator 24plex GO! Kit est validé pour une utilisation sur l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer, qui nécessite le logiciel 3500 Data Collection.

Remarque : l'utilisateur doit être connecté au PC en tant qu'administrateur local ou disposer de droits d'accès équivalents pour permettre l'écriture de données dans les fichiers appropriés.

Pour des instructions détaillées sur la configuration de l'instrument, l'étalonnage spectral ou l'application du logiciel Applied Biosystems 3500 Series Data Collection et du logiciel GeneMapper ID-X, reportez-vous au *guide d'utilisation de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*. L'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer dispose de 8 capillaires, tandis que l'Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer dispose de 24 capillaires.

Le jeu de filtres virtuels AnyDye est utilisé pour l'application combinée des 6 marqueurs fluorescents 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP et BTO. Cette matrice étalon est le BT6.

Les matériels requis pour l'électrophorèse sont indiqués dans Tableau 10.

Tableau 10. Matériel requis pour l'électrophorèse

Composant	Spécifications
Capillaire	Faisceau de 36 cm pour l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polymère	POP-4™ pour l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Tampon	Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

Étalonnage spectral ou génération de matrice

Avant de procéder à l'analyse de la taille des fragments d'ADN, effectuer un étalonnage spectral avec les 6 marqueurs fluorescents 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP et BTO pour chaque analyseur (Tableau 11). La procédure d'étalonnage génère une matrice utilisée pour corriger le chevauchement des spectres d'émission de fluorescence des colorants.

Important : l'étalonnage spectral doit être effectué pour chaque nouveau faisceau de capillaires. Il comprend les étapes suivantes :

- Préparation de l'appareil
- Préparation de la plaque d'étalonnage standard
- Montage de la plaque et chargement sur l'appareil
- Configuration du logiciel d'ensemble de colorants BT6
- Réalisation d'un cycle d'étalonnage spectral
- Vérification de la matrice

Préparation de l'appareil

Avant de procéder à l'étalonnage spectral, vérifier que l'étalonnage spatial a été réalisé. Ce processus est décrit en détail dans le *guide d'utilisation de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Tableau 11. Les 6 marqueurs fluorescents de BT6

Couleur	Matrice étalon
Bleu (B)	6-FAM
Vert (G)	BTG
Jaune (Y)	BTY
Rouge (R)	BTR2
Violet (P)	BTP
Orange (O)	BTO

Préparation de la plaque d'étalonnage standard pour 8 capillaires (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Avant d'ouvrir les tubes, les passer au vortex puis les centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.
2. Préparer un mélange de formamide et de Matrix Standard BT6 conformément à Tableau 12.

Tableau 12. Préparation du mélange de formamide et de Matrix Standard BT6 pour 8 capillaires

Composant	Volume (µl)
Hi-Di Formamide	90
Matrix Standard BT6 multicapillaire	10

3. Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
4. Charger 10 µl du mélange dans chacun des 8 puits d'une plaque de 96 puits aux positions A1–H1.
5. Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.

- Procéder à un refroidissement brutal en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min.
Il est également possible d'utiliser un thermocycleur réglé à 4 °C pour refroidir la plaque.

Préparation de la plaque d'étalonnage standard pour 24 capillaires (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

- Avant d'ouvrir les tubes, les passer au vortex puis les centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.
- Préparer un mélange de formamide et de Matrix Standard BT6 conformément à Tableau 13.

Tableau 13. Préparation du mélange de formamide et de Matrix Standard BT6 pour 24 capillaires

Composant	Volume (µl)
Hi-Di Formamide	225
Matrix Standard BT6 multicapillaire	25

- Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
- Charger 10 µl du mélange dans chacun des 24 puits d'une plaque de 96 puits aux positions A1–H1, A2–H2 et A3–H3.
- Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.
- Procéder à un refroidissement brutal en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min.
Il est également possible d'utiliser un thermocycleur réglé à 4 °C pour refroidir la plaque.

Montage de la plaque et chargement sur l'appareil

Les étapes nécessaires sont décrites en détail dans le *guide d'utilisation de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Configuration du logiciel d'ensemble de colorants BT6

Avant l'étalonnage spectral, un ensemble de colorants doit être préparé pour la Matrix Standard BT6.

1. Pour créer un nouvel ensemble de colorants, sélectionner **Library** (bibliothèque). Sous **Analyze** (analyser), accéder à **Dye Sets** (ensembles de colorants) et sélectionner **Create** (créer).
2. Saisir un nom d'ensemble de colorants (par exemple, *BT6*).
3. Sous **Chemistry** (chimie), sélectionner **Matrix Standard** (matrice étalon) et, comme **Dye Set Template** (modèle d'ensemble de colorants), sélectionner **AnyDye Template** (modèle AnyDye).
4. Sous **Calibration Peak Order** (ordre des pics d'étalonnage), disposer les couleurs comme suit : 6 – bleu, 5 – orange, 4 – vert, 3 – jaune, 2 – rouge et 1 – violet.

Remarque : il s'agit du réglage correct de l'instrument pour l'ordre des pics, bien que l'ordre des pics du Matrix Standard BT6 soit différent.

5. Modifier les réglages de **Parameters** (paramètres) comme suit :
 - Matrix Condition Number Upper Limit (limite supérieure du nombre de conditions de la matrice) : 13,5
 - Locate Start Point After Scan (localiser le point de départ après analyse) : 1000
 - Locate Start Point Before Scan (localiser le point de départ avant analyse) : 5000
 - Limit Scans To (limiter le nombre de scans à) : 2750
 - Sensitivity (sensibilité) : 0,4
 - Minimum Quality Score (score de qualité minimum) : 0,95
6. Sélectionner **Save** (enregistrer) pour confirmer les modifications.

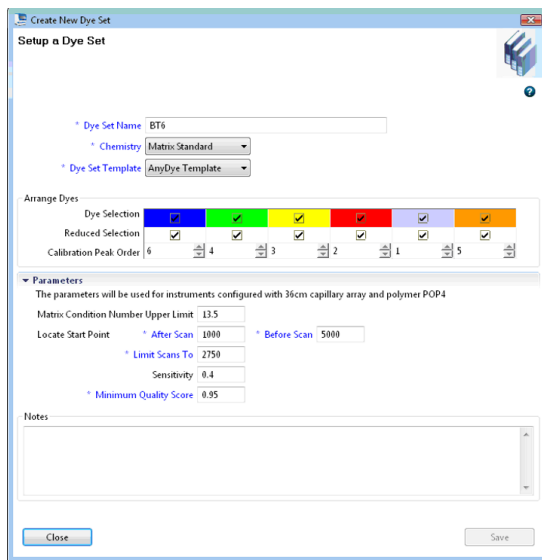


Figure 1. Configuration de l'ensemble de colorants BT6.

Réalisation d'un cycle d'étalonnage spectral

Une fois que les plaques multipuits contenant le mélange d'étalonnage spectral sont placées sur le plateau de l'échantillonneur automatique, le processus d'étalonnage spectral peut être lancé.

1. Pour accéder à l'écran Spectral Calibration (étalonnage spectral), sélectionner **Maintenance** (maintenance) sur le tableau de bord du logiciel 3500 Series Data Collection.
2. Pour configurer un cycle d'étalonnage, sélectionner **Calibrate** (étalonner), puis **Spectral** (spectral), et sélectionner **Calibration Run** (cycle d'étalonnage).

Le nombre de puits de la plaque d'étalonnage spectral et leur emplacement sur l'appareil doivent être spécifiés.

3. Sous **Chemistry Standard** (étalon de chimie), sélectionner **Matrix Standard** et, comme Dye Set Name (nom de l'ensemble de colorants), sélectionner , par exemple, le BT6 créé précédemment (consulter « Configuration logicielle de l'ensemble de colorants BT6 » à la page 38).
4. **Facultatif** : activez **Allow Borrowing** (autoriser l'emprunt).
5. Sélectionner **Start Run** (démarrer le cycle).

Vérification de la matrice

Sélectionner un capillaire dans le tableau pour afficher les résultats de chaque capillaire sous le tableau des résultats de cycle (« Capillary » [capillaire], « Quality value » [valeur de qualité] et « Condition Number » [numéro de condition]).

- La valeur de qualité (Q) de chaque capillaire doit être supérieure à 0,95 et le nombre de conditions (C) doit être compris entre 1 et 13,5.
- Vérifier que la ligne de base des échantillons de matrice est plane. Comme illustré dans Figure 2, il doit y avoir 6 pics d'une hauteur d'environ 1000–6000 RFU pour chaque échantillon de matrice.

Remarque : la plage optimale est de 3000–5000 RFU.

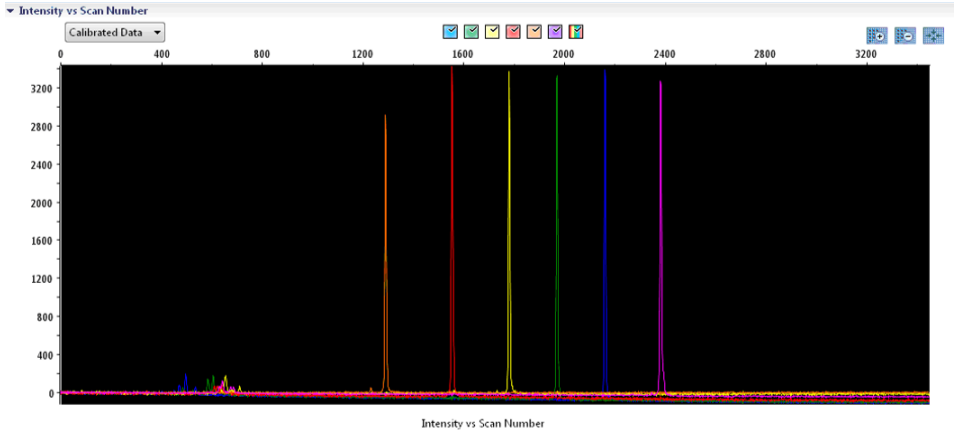


Figure 2. Électrophérogramme de l'étalonnage spectral de la Matrix Standard BT6 sur l'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Lorsqu'un étalonnage spectral est réussi, la ligne « Overall » (général) affiche des résultats en vert (Figure 3). Si la ligne « Overall » affiche des résultats en rouge, reportez-vous à la section « Spectral calibration troubleshooting » (résolution des problèmes de l'étalonnage spectral) du *guide d'utilisation de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

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

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 Not Calibrated

Figure 3. Exemple d'étalonnage spectral réussi de la Matrix Standard BT6 pour tous les capillaires sur l'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Pour chaque capillaire, sélectionner et afficher les données spectrales et les données brutes. Vérifier qu'elles respectent les critères suivants :

- L'ordre des pics sur le profil spectral est, de gauche à droite : orange, rouge, jaune, vert, bleu et violet
- Aucun pic étranger ne doit apparaître sur le profil des données brutes
- La morphologie des pics du profil spectral ne doit pas présenter de chevauchement, de fléchissement, ni d'autres irrégularités flagrants. Les pics sont séparés et bien distincts.

Si les données de tous les capillaires satisfont aux critères ci-dessus, sélectionner « **Accept** » (accepter). Si les données d'un capillaire ne satisfont pas aux critères ci-dessus, sélectionner « **Reject** » (rejeter) et consulter la section « Spectral calibration troubleshooting » (résolution des problèmes de l'étalonnage spectral) du *guide d'utilisation de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Préparation des échantillons

1. Avant d'ouvrir les tubes, les passer au vortex puis les centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.
2. Préparer un mélange de formamide et de taille standard d'ADN conformément aux informations du Tableau 14.
3. Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
4. Aliquoter 12 µl du mélange dans un tube pour chaque échantillon à analyser.
5. Ajouter 1 µl de produit de PCR ou d'échelle allélique (diluée, si nécessaire).
6. Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.
7. Procéder à un refroidissement brutal en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min.
Il est également possible d'utiliser un thermocycleur réglé à 4 °C pour refroidir la plaque.
8. Charger les échantillons sur le plateau.

Tableau 14. Préparation du mélange de formamide et de taille standard d'ADN

Composant	Volume (µl) par échantillon
Hi-Di Formamide	12,0
Taille standard d'ADN 24plex (BTO)	0,5

Remarque : étant donné que les injections ont lieu simultanément sur tous les capillaires, un minimum de 1 colonne entière (protocole à 8 échantillons) ou de 3 colonnes entières (protocole à 24 échantillons) doit être pipeté sur la plaque des analyseurs multicapillaires. Si moins d'échantillons sont analysés, les positions vides doivent être remplies avec 12 µl de Hi-Di Formamide.

Afin d'assurer la fiabilité de la localisation des allèles avec les séquenceurs multicapillaires, injecter une échelle allélique pour chaque ensemble de 24 échantillons :

- Instruments à 8 capillaires : une échelle allélique pour 3 injections
- Instruments à 24 capillaires : une échelle allélique par injection

Important : la température ambiante réelle peut influencer la performance des produits de PCR sur les instruments multicapillaires ; des épaulements ou des pics divisés peuvent donc apparaître, en particulier à des températures plus basses. **Veiller à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil.** S'assurer également que les tampons sont équilibrés aux conditions ambiantes.

Configuration d'un cycle

Si vous utilisez Investigator 24plex GO! Kit pour la première fois sur l'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, vous devrez d'abord configurer un certain nombre de protocoles :

- Protocole de l'appareil
- Taille standard

- Protocole de CQ
- Dosage

Tous les protocoles peuvent être configurés par l'intermédiaire du tableau de bord du logiciel 3500 Series Data Collection.

Protocole de l'appareil

1. Pour configurer le protocole de l'appareil, sélectionner **Library**, puis sous **Analyze**, accédez à **Instrument Protocols** (Protocoles de l'appareil). Sélectionner **Create**.

Remarque : modifier les paramètres par défaut du module de cycle « HID36_POP4 » comme indiqué dans Tableau 15.

2. Saisir ou sélectionner les paramètres dans Tableau 15.
3. Sélectionner **Save** pour confirmer les modifications.

Tableau 15. Paramètres de protocole de l'appareil pour l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Paramètre	Réglage 3500	Réglage 3500xL
Application Type (type d'application)	HID (identification humaine)	HID (identification humaine)
Capillary Length (longueur des capillaires)	36 cm	36 cm
Polymer (polymère)	POP4	POP4
Dye Set (ensemble de colorants)	par ex. BT6	par ex. BT6
Run Module (module de cycle)	HID36_POP4	HID36_POP4
Protocol Name (nom du protocole)	par exemple, Investigator 24plex	par exemple, Investigator 24plex
Oven Temperature (°C) (température du four en °C)	Par défaut (60)	Par défaut (60)
Run Voltage (tension de cycle) (kV)	13,0	13,0
Pre-Run Voltage (tension de précycle) (kV)	Par défaut (15)	Par défaut (15)
Injection Voltage (tension d'injection) (kV)	1,2	1,6
Run Time (durée de cycle) (s)	1550	1550
PreRun Time (durée de précycle) (s)	Par défaut (180)	Par défaut (180)
Injection Time (durée d'injection) (s)	30,0*	33,0*
Data Delay (délai d'attente des données) (s)	Par défaut (1)	Par défaut (1)
Advanced Options (options avancées)	Par défaut	Par défaut

* En cas d'écart par rapport aux paramètres standard, le temps d'injection peut être compris entre 1 et 35 s, selon le type d'échantillon. Si des échantillons présentent un signal très intense, il est possible de sélectionner une durée d'injection plus courte. Dans le cas d'échantillons à faible teneur en ADN, une durée d'injection allant jusqu'à 35 s peut être nécessaire.

Taille standard

1. Pour configurer la taille standard, sélectionner **Library**, puis sous **Analyze**, accéder à **Size Standards** (tailles standard). Sélectionner **Create**.
2. Saisir ou sélectionner les paramètres dans Tableau 16.

La taille standard d'ADN 24 plex (BTO) doit être utilisée avec les longueurs de fragments suivantes : 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 et 550 pb.
3. Vous pouvez également importer les paramètres de la taille standard d'ADN 24plex (BTO) à l'aide du fichier de modèle Investigator recommandé « SST-BTO_60-500bp » (Tableau 21 à la page 52).
4. Sélectionner **Save** (enregistrer) pour confirmer les modifications.

Tableau 16. Paramètres de la taille standard

Paramètre	Réglage
Size Standard (taille standard)	par ex. SST-BTO_60-500bp
Dye Color (couleur du colorant)	Orange

Protocole de CQ

1. Pour configurer le protocole de CQ, sélectionner « **Library** », puis sous « **Analyze** », accéder à « **QC Protocols** » (protocoles de CQ) et sélectionner « **Create** ».
2. Saisir ou sélectionner les paramètres dans Tableau 17.

Tableau 17. Paramètres du protocole de CQ

Paramètre	Réglage
Protocol Name (nom du protocole)	par ex. BTO_550
Size Standard (taille standard)	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller (système d'assignation des tailles)	SizeCaller v1.1.0

3. Accéder à **Analysis Settings** (paramètres d'analyse), puis à **Peak Amplitude Threshold** (seuil d'amplitude du pic), et s'assurer que toutes les couleurs sont activées.

Vérifier les paramètres d'analyse recommandés dans Tableau 20 à la page 50. Tous les autres paramètres doivent rester sur **Default** (par défaut).

4. Sélectionner **Save** pour confirmer les modifications.

Dosage

1. Pour configurer un essai, accéder à **Library**, puis sous **Manage** (gérer), accéder à **Assays** (dosages). Sélectionner **Create**.

Sélectionner les paramètres dans Tableau 18 pour analyser les fragments Investigator 24plex.

2. Sélectionner **Save** pour confirmer les modifications.

Tableau 18. Paramètres de dosage

Paramètre	Réglage
Assay Name (nom du dosage)	par exemple, Investigator 24plex
Color (couleur)	Par défaut
Application Type (type d'application)	HID (identification humaine)
Instrument Protocol (protocole de l'appareil)	par exemple, Investigator 24plex
QC Protocols	par ex. BTO_550

Démarrage du cycle d'exécution

1. Dans le tableau de bord), sélectionner « **Create New Plate** » (créer une nouvelle plaque).
2. Aller dans « **Setup** » (configuration), puis dans « **Define Plate Properties** » (définir les propriétés de la plaque) et sélectionner « **Plate Details** » (détails de la plaque). Sélectionner ou saisir les paramètres dans Tableau 19.

Tableau 19. Propriétés de la plaque

Propriété	Réglage
Name (nom)	par exemple, Investigator 24plex
Number of Wells (nombre de puits)	96
Plate Type (type de plaque)	HID (identification humaine)
Capillary Length (longueur des capillaires)	36 cm
Polymer (polymère)	POP4

3. Sélectionner **Assign Plate Contents** (attribuer le contenu de la plaque) pour confirmer les modifications.

4. Saisir le nom de l'échantillon correspondant dans chacun des puits contenant un échantillon ou une échelle allélique. Cette opération permet d'identifier les positions des puits de chaque échantillon à des fins de collecte et de traitement des données.
5. Sous **Assay** (dosage), choisir le dosage approprié pour l'analyse. Si les étapes de la section « Protocole : électrophorèse à l'aide de l'Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer » (commençant à la page 34) ont été suivies, sélectionner **Add from Library** (ajouter depuis la bibliothèque), puis sélectionner **Investigator 24plex** comme Instrument Protocol. Un dosage doit être attribué à tous les puits nommés de la plaque.
6. Répéter l'opération pour **File name conventions** (conventions de dénomination des fichiers) et **Results group** (groupe de résultats).
7. Sélectionner les puits pour lesquels un dosage doit être spécifié. Cocher les cases en regard des noms de **Assay**, **File name conventions** et **Results group** pour les attribuer aux puits sélectionnés.
8. Si ce n'est déjà fait, charger la plaque assemblée dans l'appareil et fermer la porte de celui-ci pour le réinitialiser. Sélectionner **Link Plate for Run** (lier la plaque pour l'analyse). Dans l'écran suivant, saisir le « Run Name » souhaité et sélectionner **Start Run**.

Paramètres et méthode d'analyse

Tableau 20 répertorie les paramètres d'analyse recommandés dans la feuille de calcul Peak Detector (détecteur de pics).

Tableau 20. Paramètres recommandés pour l'Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer

Paramètre	Réglages
Peak Detection Algorithm (algorithme de détection des pics)	Advanced (avancés)
Ranges (plages)	Analysis (analyse) : plage partielle Point de départ : 1000 ; Point d'arrivée : 20 000 Dimensionnement : toutes les tailles
Smoothing and Baselineing (lissage et ligne de base)	Lissage : Light (léger) Baseline Window (fenêtre de ligne de base) : 51 pts
Size Calling Method (méthode d'assignation des tailles)	Local Southern Method (méthode locale de Southern)
Peak Detection (détection des pics)	Peak Amplitude Thresholds (seuils d'amplitude du pic) B : * Y : * G : * R : * P : * O : * Min. Peak Half Width (largeur de pic à mi-hauteur) : 2 pts Polynomial Degree (degré du polynôme) : 3 Peak Window Size (taille de la fenêtre de pic) : 11 pts [†] Slope Thresholds (seuils de pente) : 0,0

* Le seuil d'amplitude du pic (valeur seuil) correspond à la hauteur de pic minimale qui sera filtrée par le logiciel GeneMapper *ID-X*. Les seuils sont généralement de 50 à 200 RFU et il revient au laboratoire de les déterminer individuellement.

Recommandation : la hauteur de pic minimale doit être 3 fois plus élevée que le bruit de fond de la ligne de base.

[†] Seul le réglage pour « Peak Window Size » est différent des valeurs par défaut d'Applied Biosystems pour l'analyse HID.

Protocole : analyse

Pour des instructions générales sur l'analyse automatique des échantillons, se reporter au guide d'utilisation approprié du logiciel GeneMapper *ID-X*.

La détermination des longueurs exactes des produits amplifiés dépend du type d'appareil, des conditions d'électrophorèse ainsi que la taille standard d'ADN utilisé. En raison de la complexité de certains loci, il convient de baser la détermination de la taille sur des références réparties uniformément. La taille standard d'ADN 24 plex (BTO) doit être utilisée avec les longueurs de fragments suivantes : 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 et 550 pb.

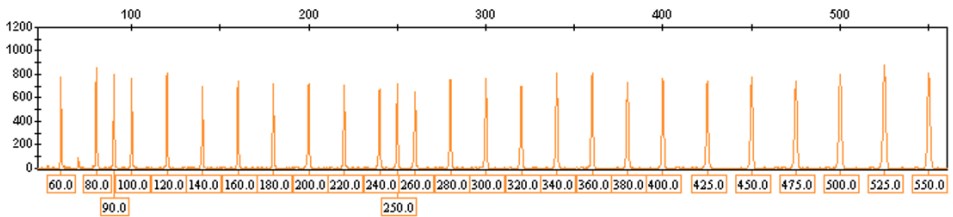


Figure 4. Électrophérogramme des fragments de la taille standard d'ADN 24 plex (BTO). Longueurs des fragments en pb.

Logiciel d'analyse

L'attribution des allèles doit être effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse approprié (par ex. GeneMapper *ID-X*) en association avec les fichiers de modèles Investigator, qui sont disponibles au téléchargement sur la page du produit (www.qiagen.com/24plex) ; voir Tableau 21 à la page suivante.

Tableau 21. Fichiers de modèles Investigator recommandés pour GeneMapper ID-X

Type de fichier	Nom de fichier
Panels*	Panels_24plex_x
BinSets*	Bins_24plex_x
Stutter	24plex_Stutter_x
Taille standard	SST-BTO_60–500bp
Méthode d'analyse	Analysis_HID_3500_200rfu
Paramètres des graphiques	Plots_6dyes

* Les fichiers Panels et BinSets doivent toujours être utilisés ; les autres fichiers de modèles sont facultatifs.

Témoins

Les allèles répertoriés dans Tableau 22 représentent l'ADN de contrôle 9948 (inclus dans le Investigator 24plex GO! Kit) et l'ADN provenant d'autres lignées cellulaires standard disponibles dans le commerce.

Pour plus de confirmation, Tableau 22 affiche les allèles d'ADN de référence achetés auprès de Coriell Cell Repositories (CCR), ainsi que 2 ADN de référence achetés auprès de CCR selon la norme de Szibor et al. (2).

Tableau 22. Attribution d'allèles de Investigator 24plex GO! Kit

Locus	CCR 9948	CCR 9947A	CCR 3657
Amélogénine	X/Y	X/X	X/Y
DYS391	10/10	–	10/10
D1S1656	14/17	18,3/18,3	13/18,3
D2S441	11/12	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	18/22
D3S1358	15/17	14/15	16/18
D5S818	11/13	11/11	11/11
D7S820	11/11	10/11	10/11
D8S1179	12/13	13/13	15/16
D10S1248	12/15	13/15	14/16
D12S391	18/24	18/20	18/19
D13S317	11/11	11/11	11/13
D16S539	11/11	11/12	13/13
D18S51	15/18	15/19	12/20
D19S433	13/14	14/15	13/14
D21S11	29/30	30/30	28/29
D22S1045	16/18	11/14	11/17
CSF1PO	10/11	10/12	11/11
FGA	24/26	23/24	18/23
SE33	23,2/26,2	19/29,2	22,2/27,2
TH01	6/9,3	8/9,3	7/9,3
TPOX	8/9	8/8	8/11
vWA	17/17	17/18	14/19

Capteur qualité

Le Investigator 24plex GO! Kit contient deux contrôles PCR internes (capteurs qualité QS1 et QS2), qui fournissent des informations utiles sur l'efficacité de l'amplification PCR en général et sur la présence d'inhibiteurs de la PCR. Les capteurs qualité internes sont inclus au mélange d'amorces et sont amplifiés en même temps que les marqueurs STR polymorphes. Les capteurs qualité sont marqués par le marqueur BTP et apparaissent sous forme de tailles de fragment de 74 pb (QS1) et 435 pb (QS2).

Pour résoudre le problème de similarité de séquence et la possibilité de liaison non spécifique, une matrice d'ADN de contrôle interne synthétique a été conçue à l'aide d'un algorithme aléatoire. La séquence matrice diffère de toutes les séquences d'ADN connues et, en particulier, ne présente aucune similitude avec l'ADN humain. Le risque de liaison non spécifique dans le cadre d'une réaction d'amplification par PCR multiplex est donc très faible.

En général, le succès de l'amplification du petit capteur qualité (QS1) indique que la PCR a été configurée et réalisée correctement, que de l'ADN ait été présent ou absent dans l'échantillon. Si aucun capteur qualité n'est détecté dans l'analyse des produits d'amplification, cela indique que le pipetage de la préparation de la PCR ou de la PCR même a été effectué de façon incorrecte. L'expérience doit être répétée en respectant scrupuleusement les consignes du protocole.

Des expériences de sensibilité ont révélé que les contrôles internes n'ont aucune incidence sur les performances de la PCR. L'amplification de faibles quantités de matrice d'ADN a montré des résultats similaires pour les mélanges d'amorces avec ou sans capteur qualité.

En outre, l'analyse des 2 fragments de contrôle interne, QS1 et QS2, et des produits d'amplification cibles STR permet une identification différentielle de la présence d'inhibiteurs ou d'une dégradation de l'ADN dans une réaction d'amplification.

En cas de dégradation de l'échantillon, l'amplification des fragments cibles de petite taille est plus efficace que celle des fragments cibles de plus grande taille. Toutefois, la dégradation de la matrice cible ne nuit pas à l'amplification des fragments de contrôle interne à partir de la matrice de contrôle interne (Figure 5). Ainsi, un rapport égal entre QS1 et QS2, associé à un rapport en faveur des produits cibles STR de petite taille, suggère une dégradation de l'échantillon.

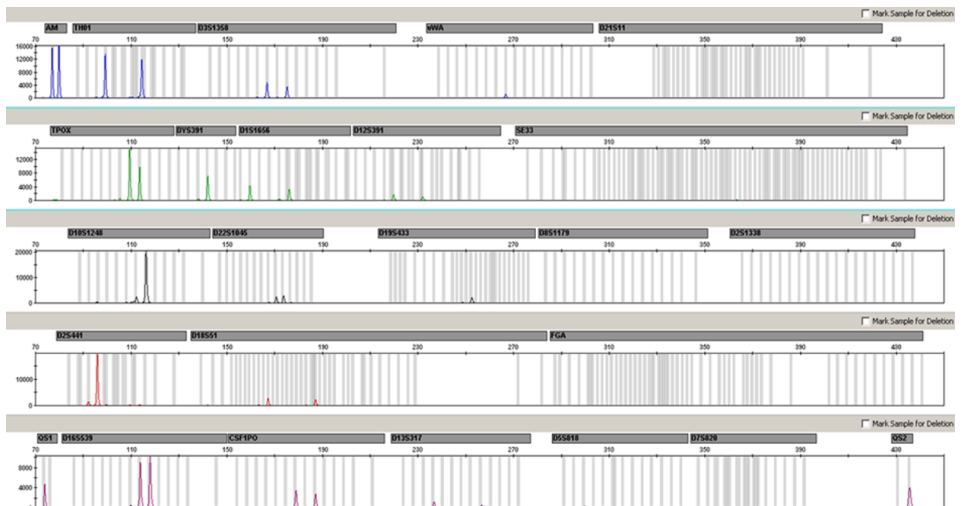


Figure 5. Électrophérogramme de l'analyse STR en présence d'ADN dégradé (fragments de 150 pb). L'ADN génomique a été fragmenté en fragments de 150 pb par ultrasons. Les gros fragments STR ont été amplifiés avec un très faible rendement de PCR mais QS1 et QS2 ont été amplifiés normalement avec des hauteurs de pics égales. Les marqueurs apparaissent en haut de l'électrophérogramme. Les capteurs qualité sont marqués avec le BTP (panneau 5) et apparaissent à des tailles de fragments de 74 pb (QS1) et 435 pb (QS2).

Si des inhibiteurs tels que l'hématine sont présents dans l'échantillon à des concentrations élevées, l'amplification est moins efficace et les fragments d'ADN les plus longs sont moins amplifiés que les plus courts. Si l'analyse des produits d'amplification indique une amplification non efficace des séquences cibles STR plus grosses et du fragment du capteur qualité (QS2) plus gros tandis que le capteur qualité (QS1) plus petit est amplifié

correctement, l'échantillon est vraisemblablement contaminé par des inhibiteurs. Cela signifie qu'un décalage du rapport en faveur du petit capteur qualité (QS1) suggère la présence d'inhibiteurs (Figure 6).

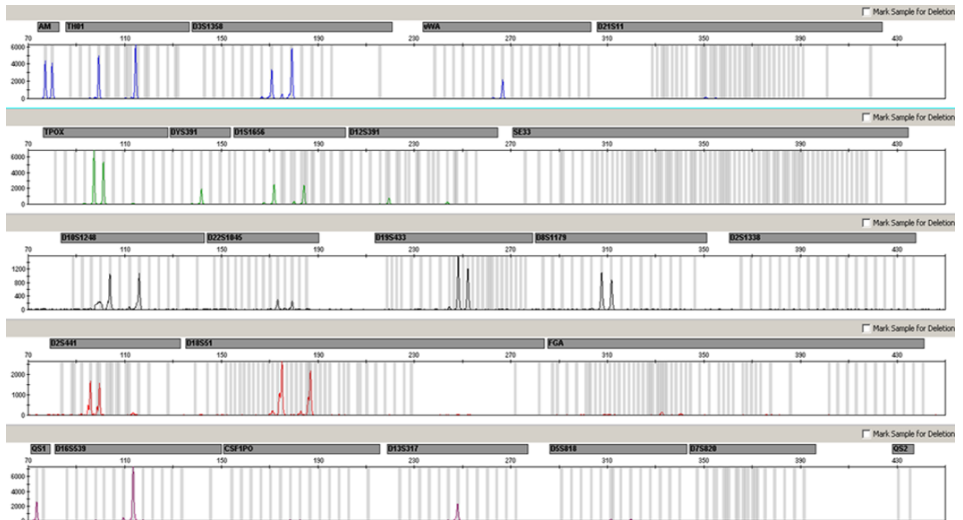


Figure 6. Électrophérogramme de l'analyse de marqueurs STR en présence d'hématine. Vingt-deux marqueurs STR, l'amélogénine et les 2 capteurs qualité ont été amplifiés en présence de 1000 µM d'hématine, puis analysés par électrophorèse capillaire. L'amplification des fragments de poids moléculaire élevé, y compris les marqueurs STR de plus de 250 pb et le QS2, a été inhibée par la forte teneur en hématine. Les marqueurs apparaissent en haut de l'électrophérogramme. Les capteurs qualité sont marqués avec le BTP (panneau 5) et apparaissent à des tailles de fragments de 74 pb (QS1) et 435 pb (QS2 non visible).

L'analyse de la présence des 2 capteurs qualité permet à l'utilisateur d'identifier de manière différentielle la présence d'inhibiteurs de la PCR ou la survenue d'une dégradation dans l'échantillon médico-légal. Cela fournit à l'utilisateur des informations utiles pour l'interprétation des données et pour la planification des étapes suivantes.

Tableau 23 résume les profils types possibles et leur signification.

Tableau 23. Aspects du profil et significations

Pics d'allèle	QS1	QS2	Interprétation
Présent	Présent	Présent	Profil réussi
Absent	Présent	Présent	Pas d'ADN
Absent	Absent	Absent	Échec de la PCR
Profil en « piste de ski »	Présent	Menu déroulant	Inhibiteurs présents
Profil en « piste de ski »	Présent	Présent	ADN dégradé

Remarque : les réactifs d'amplification pour les deux capteurs qualité sont limités dans la réaction d'amplification de l'Investigator 24plex GO!, ce qui signifie que la hauteur de pic maximale est déjà atteinte avec 25 cycles. Par conséquent, l'augmentation du nombre de cycles à, par exemple, 26 ou 27 cycles n'augmentera pas la hauteur de pic des capteurs qualité.

Remarque : les hauteurs de pic de QS1 et QS2 peuvent varier légèrement d'une expérience à l'autre. Une légère dispersion de la hauteur des pics est habituelle et ne dépend pas de l'influence des inhibiteurs. Au cours de la validation, l'analyste doit évaluer la variation courante par rapport au type d'échantillon et doit définir une plage homogène de hauteur de pic pour les deux capteurs de qualité.

Une baisse du signal de QS2 sous 20 % du signal de QS1 indique une inhibition de la PCR.

Allèles

Tableau 24 présente les allèles de l'échelle allélique. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du polymère POP-4 (Figure 7 et Tableau 24). Des séquenceurs, des tailles standard d'ADN ou des polymères différents peuvent donner des longueurs de fragments différentes. En outre, un alignement visuel sur l'échelle allélique est recommandé.

Échelle

- Horizontale : 70–470 pb
- Verticale : selon l'intensité du signal

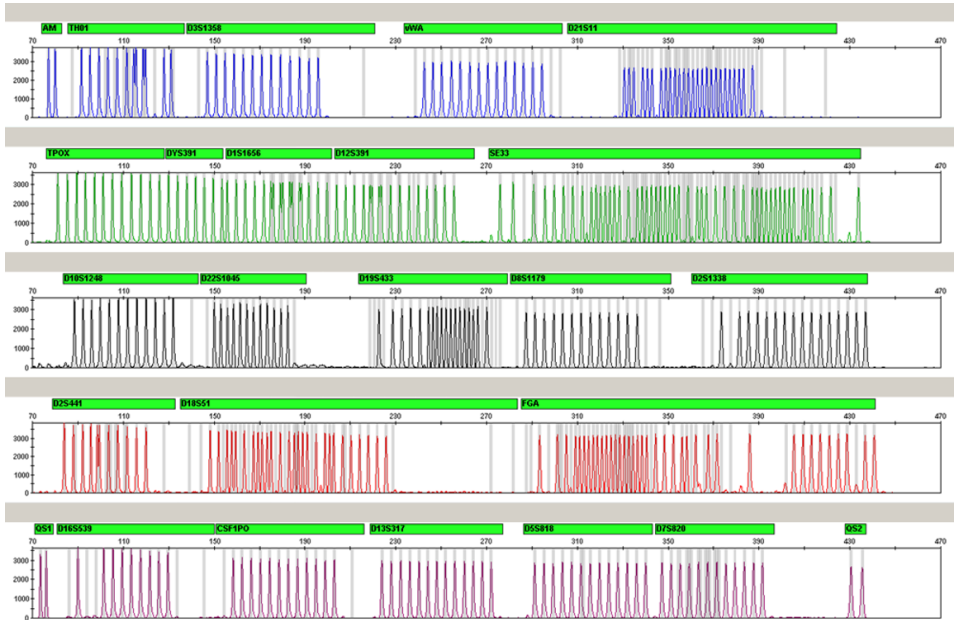


Figure 7. Électrophérogramme de l'échelle allélique 24 plex analysé sur le séquenceur Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. L'échelle allélique comprend 2 allèles pour chaque capteur qualité (QS1 et QS2). Cela permet l'appel automatique des pics de capteur de qualité pour l'analyse des échantillons.

Tableau 24. Fragments de l'échelle allélique inclus à l'échelle allélique 24 plex

Locus	Marqueur de fluorescence	Nombres de répétitions de l'échelle allélique
Amélogénine	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 9,3 ; 10 ; 10,3 ; 11 ; 13 ; 13,3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	6-FAM	24 ; 24,2 ; 25 ; 26 ; 26,2 ; 27 ; 28 ; 28,2 ; 29 ; 29,2 ; 30 ; 30,2 ; 31 ; 31,2 ; 32 ; 32,2 ; 33 ; 33,2 ; 34 ; 34,2 ; 35 ; 35,2 ; 36 ; 36,2 ; 37 ; 38
TPOX	BTG	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
DYS391	BTG	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
D1S1656	BTG	10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 14,3 ; 15 ; 15,3 ; 16 ; 16,3 ; 17 ; 17,3 ; 18 ; 18,3 ; 19,3 ; 20,3
D12S391	BTG	14, 15, 16, 17, 17,3, 18, 18,3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
SE33	BTG	3 ; 4,2 ; 6,3 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 ; 13,2 ; 14 ; 14,2 ; 15 ; 15,2 ; 16 ; 17 ; 18 ; 18,2 ; 19 ; 19,2 ; 20 ; 20,2 ; 21 ; 21,2 ; 22 ; 22,2 ; 23,2 ; 24,2 ; 25 ; 25,2 ; 26,2 ; 27,2 ; 28,2 ; 29,2 ; 30,2 ; 31 ; 31,2 ; 32 ; 32,2 ; 33 ; 33,2 ; 34 ; 34,2 ; 35 ; 36 ; 36,2 ; 37 ; 38 ; 39 ; 42
D10S1248	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D19S433	BTY	6,2 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 12,2 ; 13 ; 13,2 ; 14 ; 14,2 ; 15 ; 15,2 ; 16 ; 16,2 ; 17 ; 17,2 ; 18,2
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR2	8, 9, 10, 11, 11,3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR2	8 ; 9 ; 10 ; 10,2 ; 11 ; 12 ; 13 ; 13,2 ; 14 ; 14,2 ; 15 ; 16 ; 17 ; 17,2 ; 18 ; 18,2 ; 19 ; 20 ; 21 ; 21,2 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27 ; 28

Tableau 24. Fragments de l'échelle allélique inclus à l'échelle allélique 24 plex (suite)

Locus	Marqueur de fluorescence	Nombres de répétitions de l'échelle allélique
FGA	BTR2	14 ; 16 ; 17 ; 18 ; 18,2 ; 19 ; 19,2 ; 20 ; 20,2 ; 21 ; 21,2 ; 22 ; 22,2 ; 23 ; 23,2 ; 24 ; 24,2 ; 25 ; 25,2 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30 ; 30,2 ; 31,2 ; 33 ; 34 ; 37,2 ; 42,2 ; 43,2 ; 44,2 ; 45,2 ; 46,2 ; 47,2 ; 48,2 ; 50,2 ; 51,2
QS1	BTP	Q, S
D16S539	BTP	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D13S317	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D5S818	BTP	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
D7S820	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
QS2	BTP	Q, S

Pour plus d'informations sur les microvariants connus ne figurant pas dans l'échelle allélique Investigator 24plex, consultez le site Web du National Institute of Standards and Technology (NIST) (Institut national des normes et de la technologie) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Guide de résolution de problèmes

Ce guide de résolution de problèmes peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour plus d'informations, consulter www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx pour accéder à la Foire aux questions de notre centre d'assistance technique (pour obtenir les coordonnées, consulter www.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

De nombreux échantillons affichent des allèles hors échelle

Nombre de cycles de PCR trop élevé	Déterminer le nombre de cycles optimal en analysant un lot d'échantillons représentatifs. Réinjecter les échantillons hors échelle qui sont en conditions de cycle optimales avec une durée d'injection réduite.
------------------------------------	--

De nombreux échantillons affichent un signal faible ou pas de signal du tout

Nombre de cycles de PCR trop faible	Déterminer le nombre de cycles optimal en analysant un lot d'échantillons représentatifs.
-------------------------------------	---

Profils déséquilibrés, signaux faibles

- Volume incorrect de mélange à réaction rapide 2.0 ou de mélange d'amorces
Vérifier la configuration de la réaction et répéter l'amplification.
- Le mélange maître n'a pas été mélangé au vortex avant distribution
Mélanger soigneusement au vortex le mélange maître, puis centrifuger brièvement.
- Taille d'échantillon trop importante
Ne pas utiliser plus d'un prélèvement de 1,2 mm ni des prélèvements d'un diamètre supérieur.

Dominance des pics des capteurs qualité

Les pics de QS1 et de QS2 sont trop dominants.	À l'aide du logiciel GeneMapper <i>ID-X</i> , choisir sous « Display Settings » (paramètres d'affichage) un nouveau paramètre pour « all-dye range » (plage de tous les fluorophores) pour effectuer un zoom avant. La plage doit se trouver entre QS1 et QS2.
--	--

Important : de plus, ajuster la détermination de la taille (Ranges [plages] ; Sizing [tailles]) sur 75 → 450 dans « Analysis Method Editor » (éditeur de méthode d'analyse) sous « peak detector » (détecteur de pics).

Les hauteurs de pics de QS1 et/ou QS2 chutent dans les expériences standard

Diminution de la hauteur de pic de QS1 et QS2. Une légère dispersion de la hauteur des pics est habituelle et ne dépend pas de l'influence des inhibiteurs. Au cours de la validation, l'analyste doit évaluer la variation courante par rapport au type d'échantillon et doit définir une plage homogène de hauteur de pic pour les deux capteurs de qualité.

Une chute du signal de QS2 sous 20 % du signal de QS1 indique une inhibition de la réaction de la PCR.

Les échantillons sur écouvillon présentent un signal faible pour les marqueurs de poids moléculaire élevé.

Lyse incomplète Effectuer une lyse facultative à 95 °C.

Hauteurs de pic de taille standard trop faibles

Sensibilité de l'instrument et compétition par l'échantillon Si les hauteurs de pic de taille standard sont régulièrement inférieures à 50 RFU ou au seuil analytique du laboratoire en raison d'une compétition accrue des échantillons fortement amplifiés ou d'une faible sensibilité de l'instrument d'EC, il est possible d'utiliser jusqu'au double de la quantité de taille standard d'ADN 24plex (BTO) (1 µl de taille standard pour 11 µl de HiDi).

Matrice ou étalonnage spectral inadapté(e)

Il existe des pics de pull-up entre les panels de colorants (B, G, Y, R, P, O) avec la matrice ou l'étalonnage spectral actuel. Cette matrice ne doit pas être utilisée pour l'analyse. Répéter la génération de la matrice ou l'étalonnage spectral. Veiller à suivre scrupuleusement le protocole adapté au séquenceur utilisé.

Marquage de nombreux pics d'échantillons comme des allèles situés en dehors de l'échelle

- a. La taille standard d'ADN 24plex (BTO) n'a pas été définie ou identifiée correctement. Sélectionner l'icône orange **Size Match Editor** (éditeur de correspondance de tailles) dans la barre d'outils supérieure ou dans le logiciel GeneMapper ID ou GeneMapper ID-X. Noter les fragments orange de tous les échantillons.
- Utiliser toujours la taille standard d'ADN 24plex incluse dans les Investigator Human Identification PCR Kits.

Commentaires et suggestions

- | | |
|---|--|
| b. L'intensité des signaux est trop élevée. Si les hauteurs de pics des échantillons se trouvent hors de la plage de détection linéaire (> 5000 RFU avec les Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzers), les stutters, les pics dédoublés et les artefacts peuvent être augmentés. | Réduire le temps d'injection par paliers jusqu'à un minimum de 1 s, réduire la quantité de produit d'amplification PCR pour l'analyse ou réduire la quantité d'ADN pour la PCR. |
| c. La présence de bulles dans le capillaire entraîne des pics de remontée dans les panels de couleurs (« pics ») et conduit ainsi à une mauvaise localisation d'allèles. | Répéter l'électrophorèse pour confirmer les résultats. Vérifier le nombre maximum d'injections recommandé par le fabricant de l'appareil. Configurer un nouveau jeu de capillaires, si nécessaire. |
| d. Les différences de performances du cycle entre les capillaires d'un séquenceur multicapillaire peuvent entraîner un décalage dans la localisation des allèles. | Afin d'assurer la fiabilité de la localisation des allèles avec les séquenceurs multicapillaires, il convient d'utiliser plusieurs échelles alléliques. |
| e. Une température ambiante basse ou une température basse du tampon d'électrophorèse capillaire (CE) peut entraîner des décalages de migration des fragments ou des pics hors échelle. | Veiller à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil. Veiller à ce que les tampons soient également équilibrés en fonction des conditions ambiantes. Le préchauffage de l'appareil de CE (~30 min) est recommandé par le fabricant de l'appareil. |

Injection ou fichier de l'échelle allélique inadaptés

- | | |
|---|---|
| a. Un signal supplémentaire peut être identifié comme un pic de l'échelle allélique en raison de dysfonctionnements au cours de l'électrophorèse. Si les pics de l'échelle allélique ne sont pas correctement assignés, cette échelle ne doit pas être utilisée pour l'analyse. | Utiliser une autre injection ou un autre fichier d'échelle allélique et vérifier les données de taille des fragments de l'échelle allélique déterminées à l'aide de la taille standard (en pb).
Toujours utiliser la taille standard d'ADN 24plex avec les Investigator Human Identification PCR Kits. |
| b. Un pic de l'échelle allélique se trouve en dessous du seuil de détection des pics (50–200 RFU) de la méthode d'analyse employée et n'est donc pas identifié. | L'échelle allélique doit être chargée sur l'analyseur à une concentration supérieure à celle des échantillons à analyser.
Il est également possible d'analyser les données de l'échelle allélique avec un seuil de détection des pics inférieur dans le logiciel d'analyse. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|--|
| c. Un pic de l'échelle allélique n'est pas identifié car il se trouve en dehors de la gamme de tailles attendues définie dans le logiciel (en pb). | Comparer la longueur des fragments (en pb) du premier allèle pour une couleur de l'échelle allélique avec la valeur correspondante des catégories. Le comparer ensuite aux autres allèles. |
| d. Les allèles fractionnaires sont introuvables. | Les allèles dits « point » sont des allèles présentant une différence d'au moins 1 pb avec l'allèle entier suivant. Vérifier les paramètres de la méthode d'analyse. Réduire la valeur « Peak Window Size » à 11 points. |
| e. Les différences de performances de migration entre les capillaires d'un analyseur multicapillaire peuvent entraîner un décalage de l'assignation allélique. | Afin d'assurer la fiabilité de la localisation des allèles avec les séquenceurs multicapillaires, il convient d'utiliser plusieurs échelles alléliques. |

Références

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Rapport complémentaire de la Commission ADN de l'ISFG concernant l'utilisation des systèmes de répétitions en tandem courtes. *Int. J. Legal Med.* 110, 175.
2. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics — the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138, 37.

Annexe A : interprétation des résultats

L'analyse post-PCR et la localisation automatique des allèles à l'aide d'un logiciel d'analyse adapté permet une discrimination allélique précise et fiable.

Procédure générale d'analyse

1. Vérifier la taille standard d'ADN.
2. Vérifier l'échelle allélique.
3. Vérifier le contrôle positif.
4. Vérifier le contrôle négatif.
5. Analyser et interpréter les données des échantillons.

Pics de remontée

Des pics de remontée peuvent apparaître si les hauteurs des pics se trouvent en dehors de la plage de détection linéaire (voir le « Guide de résolution des problèmes » commençant à la page 61) ou si une matrice incorrecte a été appliquée. Ils apparaissent à des positions spécifiques dans les canaux des autres couleurs, généralement avec une intensité de signal plus faible. Afin d'éviter leur apparition, la hauteur des pics ne doit pas dépasser les seuils.

Pics de stutter

L'apparition de pics de stutter dépend de la séquence de la structure répétée et du nombre d'allèles. Les pics $n - 4$ sont dus à la perte d'une unité répétitive lors de l'amplification des motifs STR tétranucléotidiques, provoquée par les effets de glissement de la Taq ADN polymérase, tandis que les pics $n - 3$ apparaissent particulièrement lors de l'amplification du

motif STR trinuécléotidique D22S1045. Ces pics doivent être interprétés à l'aide des fichiers de modèles Investigator pour le logiciel GeneMapper *ID-X*.

Addition nucléotidique indépendante du modèle

En raison de son activité transférase terminale, la *Taq* ADN polymérase peut entraîner une adénylation incomplète à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Le pic d'artefact est plus court d'une base par rapport au pic attendu (pics -1). Toutes les amorces incluses dans Investigator 24plex GO! Kit sont conçues pour réduire au minimum ces artefacts. La hauteur du pic de l'artefact est corrélée à la quantité d'ADN. Les laboratoires doivent définir leurs propres limites pour l'analyse des pics.

Interférences

La température ambiante peut influencer la performance des produits de PCR sur les instruments multicapillaires, de sorte que des pics en épaulement ou des pics multiples apparaissent. En cas d'apparition de pics multiples, il est recommandé de réinjecter l'échantillon. Veiller à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil. Veiller à ce que les tampons soient également équilibrés en fonction des conditions ambiantes.

Annexe B : Variation des volumes de PCR à l'aide de Investigator 24plex GO! Kit

Investigator 24plex GO! Kit peut être utilisé avec des volumes de mélange réactionnel réduits de moitié (mélange à réaction rapide) + mélange d'amorces). Noter que, bien que nous ayons testé avec succès le volume de mélange réactionnel réduit mentionné ici, les meilleurs taux de réussite sont quand même obtenus dans le cadre d'une utilisation des volumes totaux de mélanges réactionnels, conformément aux recommandations de la notice du kit.

Sang ou cellules buccales sur papier FTA ou autre papier

Il est recommandé d'utiliser l'Investigator STR GO! Punch Buffer pour surmonter l'inhibition potentielle causée par le papier. Ajoutez 2 µl de STR GO! Punch Buffer quel que soit le volume final de la réaction.

Lysats sur écouvillons buccaux

Nous recommandons de réduire le volume de lysat ajouté proportionnellement à la réduction du volume de réaction, p. ex. 1 µl de lysat pour des demi-réactions. Des volumes d'entrée plus importants donnent une inhibition des amplifications par PCR.

Informations sur les commandes

Produit	Contenu	N° de cat.
Investigator 24plex GO! Kit (200)	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique 24 plex, taille standard d'ADN 24plex (BTO)	382426
Investigator 24plex GO! Kit (1000)	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique 24 plex, taille standard d'ADN 24plex (BTO)	382428
Produits connexes		
Matrix Standard BT6 (50)	Matrix étalon pour 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP et BTO, pour les Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer et Applied Biosystems SeqStudio™ Flex Genetic Analyzer	386 224
Investigator STR GO! Lysis Buffer (200)	Tampon de lyse pour 200 échantillons sur écouvillons	386516
Investigator STR GO! Punch Buffer (200)*	Tampon de perforation pour 200 échantillons de cellules épithéliales sur papier	386526
Prélèvement des échantillons		
OmniSwab Sterile (100)	100 écouvillons de prélèvement stériles munis d'une tête en forme de brosse éjectable, utilisés pour les échantillons buccaux et de salive	WB100035
EasiCollect Plus (50)	50 dispositifs de prélèvement buccal : comprennent un applicateur en mousse permettant le transfert direct de l'échantillon vers une carte QIAcard FTA Indicating intégrée.	WB120472
EasiCollect Buccal Collection Kit (50)	50 kits de prélèvement buccal : comprennent EasiCollect (incl. code-barres), enveloppe de retour, sachet à barrières multiples, gants en nitrile, ruban de sécurité et desséchant	WB120237
Uni-Core Punch 1.2 mm	Poinçon manuel permettant de prélever avec précision des disques d'échantillon sur des cartes FTA	WB100028

Produit	Contenu	N° de cat.
Investigator Human Identification PCR Kits		
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Pour une utilisation sur les systèmes en temps réel Applied Biosystems : Quantiplex Pro Reaction Mix (mélange à réaction Quantiplex Pro), Quantiplex Pro Primer Mix (mélange d'amorces Quantiplex Pro), Quantiplex Pro Control DNA M1 (M1 ADN de contrôle Quantiplex Pro), QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer (tampon de dilution d'acides nucléiques QuantiTect)	387216
Investigator Quantiplex Pro FLX Kit (576)	Pour une utilisation sur les systèmes en temps réel Applied Biosystems : 6 x plaques optiques à 96 puits sous blister individuel avec Master Mix, Control DNA M1 et QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387516
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	À utiliser avec les systèmes en temps réel QIAGEN Rotor-Gene® Q : Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix (mélange réactionnel Quantiplex Pro RGQ), Quantiplex Pro RGQ Primer Mix (mélange d'amorces Quantiplex Pro RGQ), Male Control DNA M1 (ADN de contrôle masculin M1), QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer (tampon de dilution d'acides nucléiques QuantiTect)	387316
Investigator 26plex QS Kit (100)*	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 3.0, ADN de contrôle, échelle allélique, Nuclease-free Water (eau sans nucléase)	382615
Investigator 24plex QS Kit (100)*	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique, taille standard d'ADN, Nuclease-free Water (Eau sans nucléase)	382415
Investigator Argus X-12 QS (25)*	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique, taille standard d'ADN, Nuclease-free Water (Eau sans nucléase)	383223
Investigator Argus Y-28 QS (100)*	mélange d'amorces, mélange à réaction rapide 3.0, ADN de contrôle, échelle allélique, taille standard d'ADN, Nuclease-free Water (eau sans nucléase)	383625

* Des tailles de kits plus importantes sont disponibles ; nous consulter pour en savoir plus.

Pour connaître les dernières informations sur les licences et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation QIAGEN correspondant. Les manuels de kits et les manuels d'utilisation QIAGEN sont disponibles sur www.qiagen.com ou peuvent être demandés auprès des services techniques QIAGEN ou de votre distributeur local.

Historique des révisions du document

Date	Description
02/2021	Le tableau 3 est divisé en tableaux 3a et 3b, le tableau 5 est divisé en tableaux 5a et 5b, le tableau 7 est divisé en tableaux 7a et 7b et le tableau 9 est divisé en tableaux 9a et 9b. Ajout de « Veriti™ 96-Well Thermal Cycler » et « ProFlex™ 96-well PCR System » dans la section « Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur ».
04/2024	Mise à jour des sections « Guide de résolution des problèmes » et « Informations sur les commandes ». Modifications de la mise en page et modifications rédactionnelles.
05/2026	Ajout du VeritiPro™ Thermal Cycler à la section « Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur ». Ajout d'une remarque concernant les vitesses de rampe pour les thermocycleurs rapides. Ajout d'un protocole optionnel pour les cellules buccales sur papier FTA, sur d'autres types de papier et avec le Bode Buccal Collector (collecteur buccal Bode). Mise à jour des sections « Guide de résolution des problèmes » et « Informations sur les commandes ».

Accord de licence limitée pour Investigator 24plex GO! Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du panel, conformément aux protocoles fournis avec le produit et à ce mode d'emploi. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce mode d'emploi et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par les utilisateurs de QIAGEN pour les utilisateurs de QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne les garantit pas et ne garantit pas qu'ils ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de ce Contrat de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de Contrat de licence limité ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour consulter les conditions de licence mises à jour, rendez-vous sur www.qiagen.com.

Marques déposées : QIAGEN®, Sample to Insight®, Investigator®, MinElute® (QIAGEN Group) ; Biometra® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH) ; Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ; Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG) ; GenBank® (The United States Department of Health and Human Services) ; Applied Biosystems®, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, Hi-Di™, POP-4®, ProFlex™, SeqStudio™, Veriti™ (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales). Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

05/2026 HB-1913-010 © 2026 QIAGEN, tous droits réservés.

