

Czerwiec 2015 r.

Instrukcja obsługi zestawu Investigator[®] ESSplex SE QS

Do multipleksowej amplifikacji
standardowego europejskiego
zestawu loci plus SE33 i amelogeniny

Making improvements in life possible[®]

Spis treści

Zawartość zestawu.....	4
Przechowywanie	5
Przeznaczenie.....	5
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	6
Kontrola jakości	6
Wstęp	7
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	10
Protokół: PCR Amplification (Amplifikacja PCR)	12
Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego	
ABI PRISM 3100- <i>Avant</i> /3100	15
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy	15
Przygotowanie próbki	20
Konfigurowanie oprogramowania GeneScan	21
Parametry analizy	24
Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego	
3130/3130xl firmy Applied Biosystems	25
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy	26
Przygotowanie próbki	30
Konfigurowanie oprogramowania gromadzenia danych.....	31
Parametry/metoda analizy	35

Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego	
3500/3500xL firmy Applied Biosystems.....	36
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy.....	37
Przygotowanie płytki kalibracji wzorca dla 8 kapilar (analizator genetyczny 3500 firmy Applied Biosystems)	38
Przygotowanie płytki kalibracji wzorca dla 24 kapilar (analizator genetyczny 3500xL firmy Applied Biosystems)	39
Złożenie płytki i włożenie jej do analizatora.....	40
Przygotowanie próbki.....	44
Parametry/metoda analizy	51
Protokół: Analiza	52
Oprogramowanie do analizy.....	52
Kontrola.....	54
Czujnik jakości	55
Przewodnik rozwiązywania problemów	61
Literatura	64
Załącznik: interpretacja wyników	65
Informacje dotyczące zamawiania	67

Zawartość zestawu

Zestaw Investigator ESSplex SE QS	(100)	(400)
Nr katalogowy	381575	381577
Liczba reakcji 25 µl	100	400
Fast Reaction Mix 2.0 (Szybka mieszanina reakcyjna 2.0)*	750 µl	4x750 µl
Primer Mix ESSplex SE QS (Mieszanina primerów ESSplex SE QS)	250 µl	4x250 µl
Nuclease-free water (Woda niezawierająca nukleaz)	1,9 ml	4x1,9 ml
Control DNA 9948 (0,1 ng/µl) (DNA kontrolne 9948)	200 µl	200 µl
DNA size standard 550 (BTO) (Standard wielkości DNA 550)	55 µl	220 µl
Allelic ladder ESSplex SE QS (Drabina alleli)	25 µl	3x25 µl

* Zawiera polimerazę DNA, dezoksyrybonukleotydy (dNTP), MgCl₂ i albuminę surowicy bydlęcej (BSA).

Przechowywanie

Zestaw Investigator ESSplex SE QS jest dostarczany w suchym lodzie. Natychmiast po dostarczeniu należy go umieścić w zamrażarce o stałej temperaturze od -15 do -30°C . Unikać wielokrotnego zamrażania i odmrężania. Mieszanina primerów i drabina alleli muszą być przechowywane bez dostępu światła. Próbki DNA oraz odczynniki dodawane po wykonaniu PCR (drabina alleli oraz standard wielkości DNA) należy przechowywać oddzielnie od odczynników PCR. W tych warunkach substraty zachowują stabilność do daty ważności podanej na zestawie.

Po otwarciu zestaw Investigator ESSplex SE QS można przechowywać w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 6 miesięcy lub ponownie zamrozić i przechowywać przez dłuższy czas w zamrażarce o stałej temperaturze od -15 do -30°C .

Przeznaczenie

Zestaw Investigator ESSplex SE QS jest przeznaczony do zastosowań biologii molekularnej w testach medycyny sądowej, oznaczaniu tożsamości oraz ojcostwa. Niniejszy produkt nie jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce, zapobieganiu ani leczeniu chorób.

Przy posługiwaniu się produktami należy zachować należyłą ostrożność i uwagę. Wszystkim użytkownikom produktów firmy QIAGEN zaleca się przestrzeganie wytycznych instytutu NIH dotyczących eksperymentów z użyciem rekombinowanego DNA albo innych stosownych wytycznych.

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym formacie PDF pod adresem **www.qiagen.com/safety**. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.



OSTRZEŻENIE: NIE WOLNO dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych z przygotowywania próbki.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda partia zestawów Investigator ESSplex SE QS przechodzi testy zgodności ze wstępnie określoną specyfikacją w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Wstęp

Zestaw Investigator ESSplex SE QS stosuje się w metodzie multipleks PCR w testach medycyny sądowej, oznaczaniu tożsamości oraz ojcostwa. Dochodzi wówczas do jednoczesnej amplifikacji 16 polimorficznych markerów STR zalecanych przez Europejską Sieć Instytutów Nauk Sądowych (ENFSI, ang. European Network of Forensic Science Institutes) i Europejską Grupę Profilowania DNA (EDNAP, ang. European DNA Profiling Group) jako nowy europejski standardowy zestaw loci (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11] oraz vWA) plus SE33 [ACTBP2] i swoistego dla płci locus amelogeniny.

Mieszanina primerów zestawu Investigator ESSplex SE QS zawiera dwie innowacyjne wewnętrzne kontrole PCR (czujnik jakości QS1 i QS2), zapewniające przydatne informacje dotyczące wydajności reakcji PCR oraz występowania inhibitorów reakcji PCR. Czujniki jakości ulegają amplifikacji jednocześnie z polimorficznymi znacznikami STR.

Zestaw Investigator ESSplex SE QS jest przeznaczony specjalnie do szybkiego i niezawodnego generowania profili DNA z próbek krwi, wymazów policzkowych oraz preparatów medycyny sądowej. Zestaw wykorzystuje należącą do firmy QIAGEN technologię reakcji PCR z szybkimi cyklami, która pozwala na amplifikację w ciągu około 60 minut. Zapewnia to wysoce pewne wyniki z odczynnikami odpornymi na działanie inhibitorów. Primery są wyznakowane fluorescencyjnie następującymi barwnikami:

- 6-FAM™: QS1, amelogenina, TH01, D3S1358, vWA, D21S11, QS2
- BTG: D16S539, D1S1656, D19S433, SE33
- BTY: D10S1248, D22S1045, D12S391, D8S1179, D2S1338
- BTR: D2S441, D18S51, FGA

Zalecana ilość DNA w warunkach standardowych to 0,5 ng. Wewnętrzne walidacje wykazały uzyskiwanie stabilnych i zbilansowanych wyników przy zastosowaniu 0,2–2 ng DNA oraz rzetelne wyniki przy <0,1 ng DNA.

Zestaw Investigator ESSplex SE QS poddano walidacji przy użyciu analizatora GeneAmp® PCR System 9700 (z 96-studzienkowym srebrnym blokiem pokrytym złotem) oraz analizatora genetycznego Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer.

W tabeli 1 przedstawiono loci STR wraz z mapowaniem chromosomalnym oraz motywami powtórzeń, zgodnymi z wytycznymi międzynarodowego towarzystwa na rzecz sądowych badań genetycznych (ISFG, ang. International Society for Forensic Genetics) dotyczących zastosowania markerów mikrosatelitarnych (Bär et al., 1997).

Informacje dotyczące znanych mikrowariantów niezawartych w drabinie alleli Investigator ESSplex SE QS można uzyskać na stronie Amerykańskiego Instytutu Technologii i Normalizacji (NIST, ang. National Institute of Standards and Technology) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Tabela 1. Swoiste dla loci informacje dotyczące zestawu Investigator ESSplex SE QS

Locus	Numer dostępu GenBank®	Motyw powtórzeń allele referencyjnego	Mapowanie chromosomalne
Amelogenina X	M55418	–	Xp22.1–22.3
Amelogenina Y	M55419	–	Yp11.2
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
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
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
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Wszystkie protokoły

- Formamid Hi-Di™, 25 ml (Applied Biosystems, nr kat. 4311320)
- Wzorce macierzy BT5 do analizatorów wielokapilarnych, np. ABI PRISM 3100 i analizatory genetyczne 3130 oraz 3500 firmy Applied Biosystems (numery kat. firmy QIAGEN 386123 lub 386125)
- Pipety i końcówki do pipet
- Jeden z poniższych analizatorów DNA*:
 - Analizator genetyczny ABI PRISM 3100-*Avant*™/3100
 - Analizator genetyczny Applied Biosystems 3130/3130x/
 - Analizator genetyczny Applied Biosystems 3500/3500xL
- Jeden z poniższych termocyklerów do PCR*:
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Biometra UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Probówki lub płytki do PCR
- Mikrowirówka do płytek lub probówek do PCR

* Nie jest to wyczerpująca lista dostawców i nie zawiera wielu ważnych dostawców materiałów biologicznych.

Oprogramowanie do analizy ważności produktów do stosowania przy identyfikacji u ludzi

Zestawy Investigator stosowane w reakcjach PCR do identyfikacji ludzi wymagają kalibracji przy użyciu drabiny alleli. W związku z tym używane oprogramowanie musi być zgodne z produktami do stosowania przy identyfikacji ludzi przeznaczonymi do zastosowań w medycynie sądowej. Zaleca się używanie oprogramowania GeneMapper® ID-X. Pliki szablonów Investigator ułatwiają analizę danych i można je stosować z tym oprogramowaniem.

Protokół: PCR Amplification (Amplifikacja PCR)

Ten protokół jest przeznaczony do amplifikacji w toku PCR loci STR z próbek medycyny sądowej przy użyciu zestawu Investigator ESSplex SE QS.

Ważne czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Wszystkie mieszaniny reakcyjne należy przygotowywać w miejscu oddzielnym od obszaru izolowania DNA oraz analizy produktów reakcji PCR (analizy po zakończeniu PCR).
- W celu zminimalizowania ryzyka kontaminacji krzyżowej należy stosować jednorazowe końcówki z filtrami hydrofobowymi.
- Zalecana ilość DNA w warunkach standardowych to 0,5 ng. Wewnętrzne walidacje wykazały uzyskiwanie stabilnych i zbilansowanych wyników przy zastosowaniu 0,2–2 ng DNA oraz rzetelne wyniki przy <0,1 ng DNA.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem próbek z substratami reakcji PCR należy je worteksować i krótko odwirować, w celu zebrania zawartości na dnie próbek.

Procedura

1. Rozmrozić substraty reakcji PCR oraz szablony kwas nukleinowy.

Dokładnie wymieszać. Krótko odwirować przed użyciem.

2. Przygotować mieszaninę główną (roztwór do reakcji) zgodnie z tabelą 2.

Ponieważ podczas przenoszenia może dochodzić do pewnej utraty odczynników, należy przygotować mieszaninę z uwzględnieniem dodatkowych reakcji. Należy również uwzględnić reakcje kontroli pozytywnej i negatywnej. Roztwór do reakcji zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR, oprócz DNA matrycowego (próbki) oraz wody niezawierającej nukleaz.

3. Wymieszać dokładnie mieszaninę główną, krótko odwirować i rozdzielić odpowiednie objętości do probówek PCR lub studzienek płytki do PCR.
4. Dodać DNA matrycowe i wodę niezawierającą nukleaz do mieszaniny głównej, aby uzyskać ostateczną objętość próbki wynoszącą 25 µl.
5. Przygotować kontrole pozytywne i negatywne.

Kontrola pozytywna: Użyć 5 µl DNA kontroli (tzn. 500 pg).

Kontrola negatywna: W reakcji użyć wody wolnej od nukleaz zamiast DNA matrycowego.

Tabela 2. Skład mieszaniny głównej

Składnik	Objętość na reakcję
Szybka mieszanina reakcyjna 2.0	7,5 µl
Mieszanina primerów	2,5 µl
Woda niezawierająca nukleaz (dodawana w punkcie 4)	Zmienna
DNA matrycowe (dodawane w punkcie 4)	Zmienna
Łączna objętość	25 µl

6. Jeżeli DNA matrycowe wpipetowano na krawędź lub wieczko probówki PCR, probówkę należy krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie.
7. Zaprogramować termocykler zgodnie z instrukcjami producenta, uwzględniając warunki podane w tabeli 3.

Uwaga: W przypadku korzystania z analizatora GeneAmp PCR System 9700 z blokiem aluminiowym, należy użyć opcji „Std Mode” (Tryb standardowy), a w przypadku korzystania ze srebrnego bloku 96-studzienkowego albo pokrytego złotem srebrnego bloku 96-studzienkowego należy użyć opcji „Max Mode” (Tryb maksymalny). Nie stosować opcji „9600 Emulation Mode” (Tryb emulacji 9600).

Tabela 3. Standardowy protokół cykli zalecany dla wszystkich próbek DNA

Składnik	Czas	Liczba cykli
98°C*	30 s	3 cykli
64°C	55 s	
72°C	5 s	
96°C	10 s	27 cykli
61°C	55 s	
72°C	5 s	
68°C	2 min	
10°C	∞	–

* Zastosować gorący start (hot-start) w celu aktywacji polimerazy DNA.

8. Po zakończeniu protokołu cykli próbki należy chronić przed światłem i przechowywać w temperaturze od –15 do –30°C lub przejść bezpośrednio do elektroforezy.

Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji analizatora, kalibracji widmowej, stosowania oprogramowania do gromadzenia danych ABI PRISM 3100 Data Collection w wersji 1.01 lub 1.1 oraz oprogramowania GeneScan® zawiera *Instrukcja obsługi analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100*.

Analizator z 4 kapilarami to analizator genetyczny ABI PRISM 3100-Avant, a analizator genetyczny ABI PRISM 3100 jest wyposażony w 16 kapilar.

Zestawu wirtualnych filtrów G5 używa się przy równoczesnym stosowaniu 5 fluorescencyjnych znaczników 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO. Ten wzorec macierzy jest znany jako BT5.

Materiały wymagane do elektroforezy przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Materiały wymagane do elektroforezy

Materiał	Parametry techniczne
Kapilara	36 cm układ kapilar do analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100
Polimer	Polimer POP-4™ do analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100
Bufor	Bufor do analizatora genetycznego 10x z EDTA

Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

Prawidłowa kalibracja widmowa ma ogromne znaczenie do oceny systemów wielobarwnych przy użyciu analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100 i należy ją przeprowadzić przed przystąpieniem do analizy długości fragmentów.

Procedura kalibracji tworzy macierz, której używa się do skorygowania zachodzenia na siebie widm emisji fluorescencji barwników.

Kalibracja widmowa obejmuje poniższe czynności:

- Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej
- Załadowanie wzorców do 96-studzienkowej płytki reakcyjnej (jedna próbka na kapilarę)
- Wprowadzenie składu płytki
- Oznaczenie serii kalibracji widmowej i sprawdzenie macierzy

Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej

Przykład z 4 kapilarami (analizator genetyczny ABI PRISM 3100-*Avant*)

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 5.

Tabela 5. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 4 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	60 µl
Wzorzec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	5 µl

2. Przenieś 12 µl mieszaniny do płytki 96-studzienkowej; np. pozycje A1–D1.
3. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
4. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Przykład z 16 kapilarami (analizator genetyczny ABI PRISM 3100)

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 6.

Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 16 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	204 µl
Wzorzec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	17 µl

2. Przenieś 12 µl mieszaniny do płytki 96-studzienkowej; np. pozycje A1–H1 i A2–H2.
3. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
4. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Oznaczanie serii kalibracji widmowej

Aby uzyskać pomyślną kalibrację przy użyciu oprogramowania do gromadzenia danych (Data Collection) w wersji 1.0.1 lub 1.1, należy zmodyfikować plik parametrów dla zestawu barwników DyeSetG5.

Parametr widmowy

1. Aby zmienić ustawienia w pliku parametrów, przejdź do poniższej ścieżki:
D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection SupportFiles\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles
2. Wybierz element „MtxSTD{Genescan_SetG5}”, aby otworzyć plik PAR.
3. Zmień wartość parametru „Condition Bounds Range” (Zakres granic stanu) na [1.0, 20.0].
4. Jeżeli kalibracja się nie powiodła, zmień również wartość parametru Sensitivity (Czułość) na 0.1 i Quality (Jakość) na 0.8.

5. W menu File (Plik) wybierz polecenie „Save As” (Zapisz jako) i zapisz plik parametrów pod nową nazwą, np. MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par.

Uwaga: Należy zawsze używać tego pliku parametrów do serii kalibracji widmowych wykorzystujących wzorzec macierzy BT5 firmy QIAGEN.

Okno Plate Editor (Edytor płytek) i kalibracja widmowa

1. Umieść 96-studzienkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Uruchom oprogramowanie gromadzenia danych ABI PRISM 3100 Data Collection.
3. W widoku Plate (Płytki) kliknij opcję „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytek).
4. Wprowadź nazwę płytki.
5. Wybierz opcję Spectral Calibration (Kalibracja widmowa).
6. Jako rodzaj płytki wybierz opcję „96-Well” (96-studzienkowa) i kliknij przycisk „Finish” (Zakończ).

Tabela 7. Okno Plate Editor (Edytor płytek) i kalibracja widmowa

Parametr	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadź nazwę próbek macierzy
Dye Set (Zestaw barwników)	G5
Spectral Run Module (Moduł serii widmowej)	Ustawienie domyślne (np. Spect36_POP4)
Spectral Parameters (Parametry widmowe)	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (wcześniej utworzony plik parametrów)

7. Kliknij nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę, a następnie w menu Edit (Edycja) wybierz polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do zaznaczonych próbek. Potwierdź, klikając przycisk „OK”.
8. Powiąż płytkę reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z identyfikatorem utworzonej płytki i rozpocznij serię.

9. Po zakończeniu serii sprawdź w oknie dialogowym Spectral Calibration Results (Wyniki kalibracji widmowej), czy wszystkie kapilary pomyślnie przeszły kalibrację (etykieta A). Jeżeli poszczególne kapilary są oznaczone symbolem X, należy zapoznać się z informacjami opisanymi w *Instrukcji obsługi analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100*.
10. Kliknij przycisk „OK”, aby potwierdzić zakończenie serii.

Sprawdzanie macierzy

1. W menu „Tools” (Narzędzia) wybierz najpierw polecenie „Display Spectral Calibration” (Wyświetl kalibrację widmową), a następnie opcję „Dye Set” (Zestaw barwników) i „G5”, aby sprawdzić profil kalibracji widmowej dla każdej kapilary.
2. Wartość jakości (wartość parametru Q) musi być większa niż 0,95, a wartość stanu (wartość parametru C) musi zawierać się w zakresie od 1 do 20. Obie wartości muszą zawierać się we wstępnie zdefiniowanym zakresie.
3. Sprawdź, czy w próbkach macierzy nie występuje płaska wartość wyjściowa. W każdej próbce macierzy powinno występować 5 pików o wysokości od 1000 do 5000 RFU.
Uwaga: optymalny zakres to 2000–4000 RFU.
4. Sprawdź nową macierz przy użyciu bieżących próbek. Przy użyciu nowej macierzy nie powinny występować przenikania się pików pomiędzy panelami barwników (B, G, Y, R i O czyli niebieski, zielony, żółty, czerwony i pomarańczowy).
5. W razie niepowodzenia kalibracji należy wykonać instrukcje opisane w części „Parametry widmowe” na stronie 17.
6. Jeżeli wszystkie kapilary pomyślnie przeszły kalibrację, należy ręcznie aktywować ostatni plik kalibracji dla zestawu barwników G5. W menu Tools (Narzędzia) kliknij polecenie „Set Active Spectral Calibration” (Ustaw aktywną kalibrację widmową).
7. Zmień nazwę pliku kalibracji w części Set Matrix Name (Ustaw nazwę macierzy) (np. BT5_data kalibracji).

Przygotowanie próbki

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i standardu wielkości DNA zgodnie z tabelą 1.

Tabela 8. Przygotowanie mieszaniny formamidu i standardu wielkości DNA

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	12 µl
Wzorec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	0,5 µl

2. Odmierz 12 µl porcję mieszaniny do probówki dla każdej analizowanej próbki.
3. Dodaj 1 µl produktu reakcji PCR lub drabiny alleli (w razie potrzeby po rozcieńczeniu).
4. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
5. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.

Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

6. Załaduj próbki na tacę.

Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych trzeba wpipetować 4 lub 16 próbek. Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy zappełnić 12 µl formamidu Hi-Di.

Aby zapewnić rzetelne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin.

Temperatura pomieszczenia może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w analizatorach wielokapilarnych w taki sposób, że zwłaszcza w niskich temperaturach występują piki podrzędne lub podzielone. Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta analizatora.

Konfigurowanie oprogramowania GeneScan

1. Przeedytuj jednorazowo domyślny moduł oznaczenia w obrębie zestawu barwników G5 dla pierwszego oznaczenia. Wybierz opcję „Module Editor” (Edytor modułów), aby otworzyć okno dialogowe.
2. Wybierz odpowiedni moduł oznaczenia (Run Module) jako szablon w tabeli GeneScan (patrz tabela 9).
3. Zmień wartość parametru Injection Voltage (Napięcie iniekcji) na 2,5 kV, Injection Time (Czas iniekcji) na 30 s, Run Voltage (Napięcie oznaczania) na 13 kV i Run Time (Czas oznaczania) na 30 min.
4. Kliknij polecenie „Save As” (Zapisz jako) i wprowadź nazwę nowego modułu (np. 2.5kV_30s_500bp). Potwierdź, klikając przycisk „OK”.
5. Kliknij przycisk „Close” (Zamknij), aby zamknąć okno Run Module Editor (Edytor modułu oznaczenia).

Tabela 9. Uruchom moduł 2.5kV_30s_500bp w analizatorze genetycznym ABI PRISM 3100-Avant#3100

Parametr	Ustawienia
Run Temperature (Temperatura oznaczenia) (°C)	Ustawienie domyślne
Cap Fill Volume (Objętość napełnienia zamknięcia)	Ustawienie domyślne
Maximum Current (Maksymalne natężenie) (A)	Ustawienie domyślne
Current Tolerance (Tolerancja natężenia) (A)	Ustawienie domyślne
Run Current (Natężenie oznaczenia) (A)	Ustawienie domyślne
Voltage Tolerance (Tolerancja napięcia) (kV)	Ustawienie domyślne
Pre-Run Voltage (Napięcie oznaczenia wstępnego) (kV)	Ustawienie domyślne
Pre-Run Time (Czas oznaczenia wstępnego) (s)	Ustawienie domyślne
Injection Voltage (Napięcie iniekcji) (kV)	2,5
Injection Time (Czas iniekcji) (s)	30*
Run Voltage (Napięcie oznaczenia) (kV)	13
Number of Steps (Liczba etapów)	Ustawienie domyślne
Voltage Step Interval (Interwał etapu napięcia)	Ustawienie domyślne
Data Delay Time (Czas opóźnienia danych) (s)	Ustawienie domyślne
Run Time (Czas oznaczenia) (min)	30†

* W zależności od rodzaju próbki można odejść od ustawień standardowych i wybrać czas iniekcji od 1 do 35 sekund. W przypadku oznaczania próbek o bardzo wysokim natężeniu sygnału można wybrać krótszy czas iniekcji. W przypadku próbek o niskiej zawartości DNA może wystąpić konieczność użycia czasu iniekcji do 35 s.

† Czas oznaczania zestawu Investigator ESSplex SE QS zmodyfikowano, aby móc analizować fragmenty o długości do 500 pz.

Uruchamianie wirowania

1. Umieść przygotowaną 96-studzienkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Uruchom oprogramowanie gromadzenia danych ABI PRISM 3100 Data Collection.
3. W widoku Plate (Płytki) kliknij opcję „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytek).
4. Wprowadź nazwę płytki.
5. Jako rodzaj aplikacji wybierz opcję „GeneScan”.
6. Jako rodzaj płytki wybierz opcję „96-Well” (96-studzienkowa) i kliknij przycisk „Finish” (Zakończ).

Tabela 10. Ustawienia w oknie Plate Editor (Edytor płytek)

Parametr	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadź nazwę próbek macierzy
Dyes (Barwniki)	O
Color Info (Informacje o kolorach)	Ladder (Drabina) lub Sample (Próbka)
Project Name (Nazwa projektu)	Np. 3100_projekt1
Dye Set (Zestaw barwników)	G5
Run Module (Moduł oznaczenia)	2.5kV_30s_500bp*
Analysis Module 1 (1. moduł analizy)	DefaultAnalysis.gsp

* Patrz tabela 9, „Uruchom moduł 2.5kV_30s_500bp w analizatorze genetycznym ABI PRISM 3100-Avant/3100”.

- Wypełnij tabelę w oknie Plate Editor (Edytor płytek) i kliknij przycisk „OK”.
- Kliknij nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę, a następnie w menu Edit (Edycja) wybierz polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do zaznaczonych próbek.
- Powiąz płytke reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z identyfikatorem utworzonej płytki i rozpocznij serię.
- Po zakończeniu oznaczenia wyświetl dane jako dane barwne (opcja Color Data) w widoku Array View (Widok macierzy) oprogramowania gromadzenia danych 3100 Data Collection lub jako pliki przeanalizowanych próbek dostępne po otwarciu ścieżki D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns.

Parametry analizy

W tabeli 11 wymieniono zalecane parametry analizy.

Tabela 11. Zalecane parametry analizy dla analizatora genetycznego ABI PRISM 3100-Avant/3100

Parametr	Ustawienia
Analysis Range (Zakres analizy)	Start (Początek): 2000
Stop (Koniec): 10 000	
Data Processing (Przetwarzanie danych)	Baseline (Wartość wyjściowa): Zaznaczone Multi-component (Wiele substratów): Zaznaczone Smooth options (Opcje wygładzania): Light (Lekkie)
Peak Detection (Wykrywanie pików)	Peak Amplitude Thresholds (Wartości progowe amplitudy piku) B*: Y*: G*: R*: O*: Min. Peak Half Width (Min. szerokość połówkowa piku): 2 punkty Polynomial Degree (Stopień wielomianu): 3 Peak Window Size (Rozmiar okna piku): 11 punktów [†]
Size Call Range (Zakres określania rozmiaru)	Min.: 60 Maks.: 550
Size Calling Method (Metoda określania rozmiaru)	Lokalna metoda Southerna
Split Peak Correction (Korekcja pików podzielonych)	None (Brak)

* Wartość progowa (graniczna) amplitudy piku odpowiada minimalnej wysokości piku, jaka będzie wykrywana przez oprogramowanie GeneScan lub GeneMapper *ID*. Wartości progowe na ogół zawierają się w zakresie od 50 do 200 RFU i każde laboratorium powinno je ustalić indywidualnie. Zalecenie: Minimalna wysokość piku powinna być 3 razy większa od szumu tła linii bazowej.

[†] Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna piku) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

Uwaga: W celu uzyskania informacji dotyczących stosowania zalecanych plików szablonów (jako parametrów analizy), należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi plików szablonów Investigator (GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X*).

Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego 3130/3130xl firmy Applied Biosystems

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji analizatora, kalibracji widmowej lub stosowania oprogramowania gromadzenia danych ABI PRISM Data Collection w wersji 3.0 oraz oprogramowania GeneMapper ID zawiera *Wstępna instrukcja obsługi analizatorów genetycznych 3130/3130xl firmy Applied Biosystems*.

Analizator z 4 kapilarami to analizator genetyczny 3130 firmy Applied Biosystems a analizator genetyczny 3130xl firmy Applied Biosystems jest wyposażony w 16 kapilar.

Zestawu wirtualnych filtrów „Any5Dye” (5 dowolnych barwników) używa się przy równoczesnym stosowaniu 5 fluorescencyjnych znaczników 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO. Ten wzorzec macierzy jest znany jako BT5.

Materiały wymagane do elektroforezy przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Materiały wymagane do elektroforezy

Materiał	Parametry techniczne
Kapilara	36 cm układ kapilar do analizatora genetycznego 3130/3130xl firmy Applied Biosystems
Polimer	Polimer POP-4 do analizatora genetycznego 3130/3130xl
Bufor	Bufor do analizatora genetycznego 10x z EDTA

Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

Przed przeprowadzeniem analizy rozmiaru fragmentów DNA konieczne jest wykonanie kalibracji widmowej przy użyciu 5 znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO) dla każdego analizatora. Procedura kalibracji tworzy macierz, której używa się do skorygowania zachodzenia na siebie widm emisji fluorescencji barwników.

Kalibracja widmowa obejmuje poniższe czynności:

- Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej
- Załadowanie wzorców do 96-studzienkowej płytki reakcyjnej (jedna próbka na kapilarę)
- Utworzenie protokołu analizatora dla kalibracji widmowej (narzędzie Protocol Manager (Menedżer protokołów))
- Zdefiniowanie składu płytki w edytorze płytek (narzędzie Plate Manager (Menedżer płytek))
- Oznaczenie serii kalibracji widmowej i sprawdzenie macierzy

Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej

Przykład z 4 kapilarami (analizator genetyczny PRISM 3130 firmy Applied Biosystems)

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 13.

Tabela 13. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 4 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	60 µl
Wzorec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	5 µl

2. Przenieś 12 µl mieszaniny do płytki 96-studzienkowej; np. pozycje A1–D1.
3. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.

4. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
5. Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Przykład z 16 kapilarami (analizator genetyczny PRISM 3130x/ firmy Applied Biosystems)

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 14.

Tabela 14. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 16 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	204 µl
Wzorzec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	17 µl

2. Przenieś 12 µl mieszaniny do płytki 96-studzienkowej; np. pozycje A1–H1 i A2–H2.
3. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
4. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Oznaczanie serii kalibracji widmowej

1. Umieść 96-studzienkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. W narzędziu Protocol Manager (Menedżer protokołów) oprogramowania do gromadzenia danych otwórz okno Instrument Protocol (Protokół analizatora).
3. Kliknij przycisk „New” (Nowy), aby otworzyć okno dialogowe Protocol Editor (Edytor protokołów).
4. Wypełnij okno dialogowe przy użyciu informacji zawartych w tabeli 15 i kliknij przycisk „OK”.

Tabela 15. Protokół analizatora do kalibracji widmowej

Protocol Editor (Edytor protokołów)	Ustawienia
Name (Nazwa)	Użytkownika (np. Widmowa36_POP4_BT5)
Type (Rodzaj)	SPECTRAL (Widmowa)
Dye Set (Zestaw barwników)	Any5Dye (5 dowolnych barwników)
Polymer (Polimer)	Użytkownika (np. POP4)*
Array Length (Długość układu)	Użytkownika (np. 36cm)*
Chemistry (Warunki chemiczne)	Standard dla macierzy
Run Module (Moduł oznaczenia)	Ustawienie domyślne (np. Spect36_POP4_1)*

* Zależnie od rodzaju używanego polimeru i długości kapilary.

5. W narzędziu Plate Manager (Menedżer płytek) oprogramowania gromadzenia danych kliknij przycisk „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe New Plate (Nowa płytka).
6. Wprowadź informacje zawarte w tabeli 16 i kliknij przycisk „OK”. Nastąpi automatyczne otwarcie nowej tabeli w oknie Plate Editor (Edytor płytek) (tabela 17).

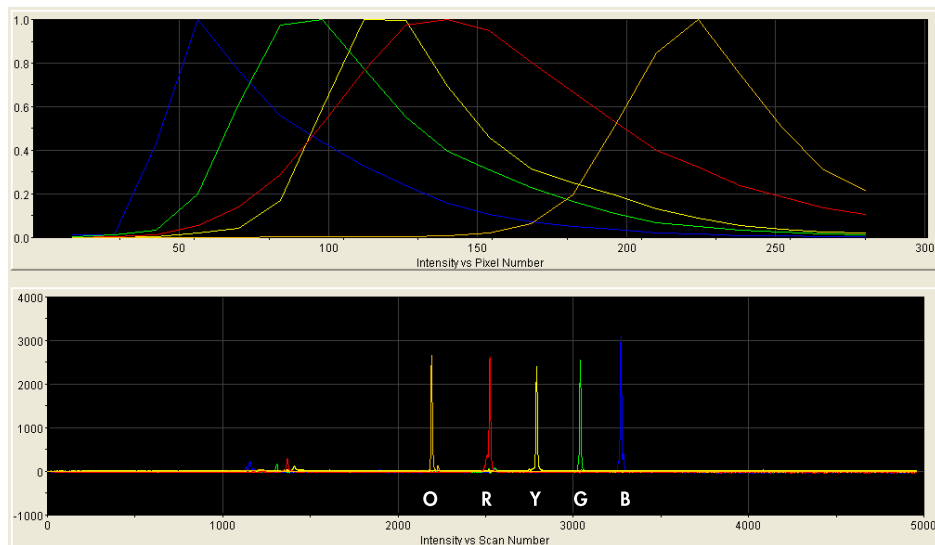
Tabela 16. Okno Plate Editor (Edytor płytek) i kalibracja widmowa (I)

Okno dialogowe New plate (Nowa płytka)	Ustawienia
Name (Nazwa)	np. Widmowa_BT5_data
Application (Zastosowanie)	Spectral Calibration (Kalibracja widmowa)
Plate Type (Rodzaj płytki)	96-well (96-studzienkowa)
Owner Name/Operator Name (Imię i nazwisko właściciela/operatora)	...

Tabela 17. Okno Plate Editor (Edytor płytek) i kalibracja widmowa (II)

Okno dialogowe New plate (Nowa płytka)	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadź nazwę próbek macierzy
Priority (Priorytet)	np. 100
Instrument Protocol 1 (1. protokół analizatora)	Spectral36_POP4_BT5 (wcześniej opisane ustawienie)

7. Kliknij nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę, a następnie w menu Edit (Edycja) wybierz polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do zaznaczonych próbek. Potwierdź, klikając przycisk „OK”.
8. Powiąż płytkę reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z identyfikatorem utworzonej płytki (pozycja A lub B) i rozpocznij serię.



Rysunek 1. Elektroforegram kalibracji widmowej z wzorcem macierzy BT5 wykonanej przy użyciu analizatora genetycznego 3130 firmy Applied Biosystems.

Sprawdzanie macierzy

1. Wartość jakości (wartość parametru Q) każdej kapilary musi być większa niż 0,95, a wartość stanu (wartość parametru C) musi zawierać się w zakresie od 1 do 20.
2. Sprawdź, czy w próbkach macierzy nie występuje płaska wartość wyjściowa. Jak przedstawiono na ilustracji na poprzedniej stronie, w każdej próbce macierzy powinno występować 5 pików o wysokości od około 1000 do 5000 RFU.
3. Uwaga: Optymalny zakres to 2000–4000 RFU.

4. Sprawdź nową macierz przy użyciu bieżących próbek. Przy użyciu nowej macierzy nie powinny występować przenikania się pików pomiędzy panelami barwników (B, G, Y, R i O czyli niebieski, zielony, żółty, czerwony i pomarańczowy).
5. W razie niepowodzenia kalibracji należy zastosować zoptymalizowane wartości wzorca macierzy BT5 i powtórzyć serię kalibracji.
6. Jeżeli wszystkie kapilary pomyślnie przeszły test, w oknie Spectral Viewer (Przeglądarka widmowa) automatycznie zostanie uaktywniony ostatni plik kalibracji dla zestawu barwników Any5Dye (5 dowolnych barwników). Zmień nazwę pliku kalibracji (np. BT5_data kalibracji).

Przygotowanie próbki

1. Przygotuj mieszaninę formamidu i standardu wielkości DNA zgodnie z tabelą 18.

Tabela 18. Przygotowanie mieszaniny formamidu i standardu wielkości DNA

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	12,0 µl
Standard wielkości DNA 550 (BTO)	0,5 µl

2. Odmierz 12 µl porcję mieszaniny do probówki dla każdej analizowanej próbki.
3. Dodaj 1 µl produktu reakcji PCR lub drabiny alleli (w razie potrzeby po rozcieńczeniu).
4. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
5. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.
6. Załaduj próbki na tacę.

Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych trzeba wpipetować 4 lub 16 próbek. Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy zapisać 12 µl formamidu Hi-Di.

Aby zapewnić rzetelne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin.

Temperatura pomieszczenia może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w analizatorach wielokapilarnych w taki sposób, że zwłaszcza w niskich temperaturach występują piki podrzędne lub podzielone. Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta analizatora.

Konfigurowanie oprogramowania gromadzenia danych

1. Przeedytuj jednorazowo moduł oznaczenia dla pierwszego oznaczenia. W narzędziu Module Manager (Menedżer modułów) oprogramowania gromadzenia danych kliknij przycisk „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe Run Module Editor (Edytor modułów oznaczeń).

Uwaga: Zmień domyślne ustawienia modułu oznaczenia z „HIDFragmentAnalysis36_POP4_1” na wskazane w tabeli 19.

2. Zmień wartość parametru Injection Voltage (Napięcie iniekcji) na 2,5 kV, Injection Time (Czas iniekcji) na 30 s, Run Voltage (Napięcie oznaczania) na 13 kV i Run Time (Czas oznaczania) na 1800 s (tabela 19).
3. Kliknij polecenie „Save As” (Zapisz jako), wprowadź nazwę nowego modułu oznaczenia (np. 2.5kV_30s_500bp) i potwierdź, klikając przycisk „OK”.
4. Kliknij przycisk „Close” (Zamknij), aby zamknąć okno Run Module Editor (Edytor modułu oznaczenia).

Tabela 19. Uruchom moduł 2.5kV_30s_500bp w analizatorze genetycznym 3130/3130x/ firmy Applied Biosystems

Parametr	Ustawienia
Oven Temperature (Temperatura wypiekania) (°C)	Ustawienie domyślne
Poly Fill Volume (Objętość napełnienia polimeru)	Ustawienie domyślne
Current Stability (Stabilność natężenia) (μA)	Ustawienie domyślne
Pre-Run Voltage (Napięcie oznaczenia wstępnego) (kV)	Ustawienie domyślne
Pre-Run Time (Czas oznaczenia wstępnego) (s)	Ustawienie domyślne
Injection Voltage (Napięcie iniekcji) (kV)	2,5
Injection Time (Czas iniekcji) (s)	30*
Voltage Number of Steps (Liczba etapów napięcia)	Ustawienie domyślne
Voltage Step Interval (Interwał etapu napięcia)	Ustawienie domyślne
Data Delay Time (Czas opóźnienia danych) (s)	Ustawienie domyślne
Run Voltage (Napięcie oznaczenia) (kV)	13 kV
Run Time (Czas oznaczania) (s)	1800 [†]

* Można odejść od ustawień standardowych i wybrać czas iniekcji od 1 do 35 sekund, w zależności od rodzaju próbki. W przypadku oznaczania próbek o bardzo wysokim natężeniu sygnału można wybrać krótszy czas iniekcji. W przypadku próbek o niskiej zawartości DNA może wystąpić konieczność użycia czasu iniekcji do 35 s.

[†] Zmodyfikowano czas oznaczania zestawu Investigator ESSplex SE QS, aby móc analizować fragmenty o długości do 500 pz.

Uruchamianie wirowania

1. Umieść przygotowaną 96-studzienkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Otwórz narzędzie Protocol Manager (Menedżer protokołów) oprogramowania do gromadzenia danych.
3. W oknie Instrument Protocol (Protokół analizatora) kliknij przycisk „New” (Nowy), aby otworzyć okno dialogowe Protocol Editor (Edytor protokołu) i wprowadzić informacje zawarte w tabeli 20.
4. Kliknij przycisk „OK”, aby zamknąć okno Protocol Editor (Edytor protokołu).

Tabela 20. Ustawienia w oknie Instrument Protocol (Protokół analizatora)

Protocol Editor (Edytor protokołów)	Ustawienia
Name (Nazwa)	Run36_POP4_BT5_26min
Type (Rodzaj)	REGULAR
Run Module (Moduł oznaczenia)	2.5kV_30s_500bp*
Dye Set (Zestaw barwników)	Any5Dye

* Patrz tabela 19, „Uruchom moduł 2.5kV_30s_500bp w analizatorze genetycznym 3130/3130xl firmy Applied Biosystems”.

1. Przed każdym oznaczeniem należy utworzyć definicję płytki. W narzędziu Plate Manager (Menedżer płytek) oprogramowania do gromadzenia danych kliknij przycisk „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe New Plate (Nowa płytka).
2. Wprowadź informacje zawarte w tabeli 21.

Tabela 21. Narzędzie Plate Editor (Edytor płytek) aplikacji GeneMapper (I)

Protocol Editor (Edytor protokołów)	Ustawienia
Name (Nazwa)	np. Płytką_BT5_Data
Application (Zastosowanie)	Wybierz aplikację GeneMapper
Plate type (Rodzaj płytki)	96-well (96-studzienkowa)
Owner Name/Operator Name (Imię i nazwisko właściciela/operatora)	...

3. Kliknij przycisk „OK”. Nastąpi automatyczne otwarcie nowej tabeli w oknie Plate Editor (Edytor płytek) (tabela 22).
4. Kliknij nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę. W menu Edit (Edycja) wybierz polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do wszystkich zaznaczonych próbek. Kliknij przycisk OK.
5. W narzędziu Run Scheduler (Narzędzie planowania oznaczeń) kliknij polecenie „Find All” (Znajdź wszystko) i wybierz opcję „Link” (Powiąz), aby powiązać płytkę reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z rekordem nowo utworzonej płytki (pozycja A lub B).

Tabela 22. Narzędzie Plate Editor (Edytor płytek) aplikacji GeneMapper (II)

Parametr	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadź nazwę próbki
Priority (Priorytet)	np. 100 (ustawienie domyślne)
Sample Type (Rodzaj próbki)	Sample (Próbka) lub Allelic Ladder (Drabina alleli)
Size Standard (Standard wielkości)	np. SST-BTO_60-500bp
Panel	np. ESSplex_SE_QS_Panele
Analysis Method (Metoda analizy)	np. Analiza_HID_3130
Snp Set (Zestaw Snp)	–
User-defined 1–3 (Zdefiniowane przez użytkownika 1–3)	–
Results Group 1 (Grupa wyników 1)	(wybierz grupę wyników)
Instrument Protocol 1 (1. protokół analizatora)	Run36_POP4_BT5_26min (ustawienie opisane wcześniej)

6. Rozpocznij oznaczenie.
7. W trakcie oznaczenia sprawdź status błędu (pozycja Error Status) w części Event Log (Dziennik zdarzeń) lub sprawdź jakość danych pierwotnych dla każdej kapilary w przeglądarce Capillaries Viewer (Przeglądarka kapilar) lub Cap/Array Viewer (Przeglądarka zamknięć/matrycy).
8. Wyświetl dane jako przegląd w sekcji Run History (Historia oznaczeń) lub Cap/Array Viewer (Przeglądarka zamknięć/matrycy) oprogramowania gromadzenia danych. Dane oznaczenia są zapisywane w folderze Run (Oznaczenie) wcześniej wybranej grupy wyników.

Parametry/metoda analizy

W tabeli 23 wymieniono zalecane parametry analizy.

Tabela 23. Zalecane ustawienia dla analizatora genetycznego 3130/3130x/ firmy Applied Biosystems

Parametr	Ustawienia
Peak Detection Algorithm (Algorytm wykrywania pików)	Advanced (Zaawansowany)
Zakresy	Analysis (Analiza): Partial Range (Zakres częściowy) Start Point (Punkt początkowy): 2000; Stop Point (Punkt końcowy): 10 000 Sizing (Rozmiar): All Sizes (Wszystkie rozmiary)
Smoothing (Wyglądanie) i Baseline (Linia bazowa)	Smoothing (Wyglądanie): Light (Lekkie) Baseline Window (Okno wyjściowe): 51 punkty
Size Calling Method (Metoda określania rozmiaru)	Lokalna metoda Southerna
Peak Detection (Wykrywanie pików)	Peak Amplitude Thresholds (Wartości progowe amplitudy piku) B*: Y*: G*: R*: O*: Min. Peak Half Width (Min. szerokość połówkowa piku): 2 punkty Polynomial Degree (Stopień wielomianu): 3 Peak Window Size (Rozmiar okna piku): 11 punktów [†] Próg testu: 0,0

* Wartość progowa (graniczna) amplitudy piku odpowiada minimalnej wysokości piku, jaka będzie wykrywana przez oprogramowanie GeneMapper *ID* lub *ID-X*. Wartości progowe na ogół zawierają się w zakresie od 50 do 200 RFU i każde laboratorium powinno je ustalić indywidualnie. Zalecenie: Minimalna wysokość piku powinna być 3 razy większa od szumu tła linii bazowej.

[†] Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna piku) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

Uwaga: W celu uzyskania informacji dotyczących stosowania zalecanych plików szablonów (jako parametrów analizy), należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi plików szablonów Investigator (GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X*).

Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora genetycznego 3500/3500xL firmy Applied Biosystems

Zestaw Investigator ESSplex SE QS zatwierdzono do stosowania w analizatorze genetycznym 3500/3500xL, który wymaga następującego oprogramowania:

- oprogramowanie do gromadzenia danych 3500 Data Collection Software w wersji v1 lub v2
- HID Updater 3500 Data Collection v2.0

Uwaga: Użytkownik musi być zalogowany na komputerze PC jako lokalny administrator lub przy użyciu równoważnych praw dostępu, aby umożliwić zapisywanie danych w odpowiednich plikach.

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji analizatora, kalibracji widmowej lub stosowania oprogramowania do gromadzenia danych 3500 Series Data Collection Software firmy Applied Biosystems w wersji v1 lub v2 oraz oprogramowania GeneMapper *ID-X* w wersji v1.2 zawiera *Instrukcja obsługi analizatorów genetycznych 3500/3500xL firmy Applied Biosystems*.

System z 8 kapilarami to analizator genetyczny 3500 firmy Applied Biosystems. System z 24 kapilarami to analizator genetyczny 3500xL firmy Applied Biosystems.

Zestawu wirtualnych filtrów „AnyDye” (Dowolny barwnik) używa się przy równoczesnym stosowaniu 5 fluorescencyjnych znaczników 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO. Ten wzorec macierzy jest znany jako BT5.

Materiały wymagane do elektroforezy przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Materiały wymagane do elektroforezy

Materiał	Parametry techniczne
Kapilara	36 cm matryca do analizatora genetycznego 3500/3500xL firmy Applied Biosystems
Polimer	POP-4 do analizatora genetycznego 3500/3500xL firmy Applied Biosystems
Bufor	Pojemnik z buforem anodowym Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Pojemnik z buforem katodowym Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

Przed przeprowadzeniem analizy rozmiaru fragmentów DNA konieczne jest wykonanie kalibracji widmowej przy użyciu 5 znaczników fluorescencyjnych (6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO) dla każdego analizatora (tabela 25). Procedura kalibracji tworzy macierz, której używa się do skorygowania zachodzenia na siebie widm emisji fluorescencji barwników.

Ważne: Kalibrację widmową należy wykonać dla każdej nowej matrycy kapilar. Składa się ona z następujących etapów:

- Przygotowanie analizatora
- Przygotowanie płytki kalibracji wzorca
- Złożenie płytki i włożenie jej do analizatora
- Konfiguracja oprogramowania pod kątem zestawu barwników BT5
- Oznaczanie serii kalibracji widmowej
- Sprawdzanie macierzy

Przygotowanie analizatora

Przed procesem kalibracji widmowej należy upewnić się, że wykonano kalibrację przestrzenną. Ten proces szczegółowo opisano w *Instrukcji obsługi analizatorów genetycznych 3500/3500xL firmy Applied Biosystems*.

Tabela 25. 5 fluorescencyjnych znaczników zestawu BT5

Kolor	Standard dla macierzy
Niebieski (B)	6-FAM
Zielony (G)	BTG
Żółty (Y)	BTY
Czerwony (R)	BTR
Pomarańczowy (O)	BTO

Przygotowanie płytki kalibracji wzorca dla 8 kapilar (analizator genetyczny 3500 firmy Applied Biosystems)

1. Przed otwarciem probówek należy je worteksować i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 26.

Tabela 26. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 8 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	90 µl
Wzorzec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	10 µl

3. Worteksuj, a następnie krótko odwiruj mieszaninę.
4. Przenieś 10 µl mieszaniny do każdej z 8 studzienek płytki 96-studzienkowej w pozycjach A1–H1.

5. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
6. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Przygotowanie płytki kalibracji wzorca dla 24 kapilar (analizator genetyczny 3500xL firmy Applied Biosystems)

1. Przed otwarciem probówek należy je worteksować i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotuj mieszaninę formamidu i wzorca macierzy BT5 zgodnie z tabelą 27.

Tabela 27. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca macierzy BT5 dla 24 kapilar

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	225 µl
Wzorzec macierzy BT5 z wieloma zatyczkami.	25 µl

3. Worteksuj, a następnie krótko odwiruj mieszaninę.
4. Przenieś 10 µl mieszaniny do każdej z 24 studzienek płytki 96-studzienkowej w pozycjach A1–H1, A2–H2 i A3–H3.
5. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
6. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

Złożenie płytki i włożenie jej do analizatora

Wymagane czynności szczegółowo opisano w *Instrukcji obsługi analizatorów genetycznych 3500/3500xL firmy Applied Biosystems*.

Konfiguracja oprogramowania pod kątem zestawu barwników BT5

Przed kalibracją widmową należy skonfigurować zestaw barwników dla standardu macierzy BT5.

1. Aby utworzyć nowy zestaw barwników, wybierz opcję „Library” (Biblioteka). W części „Analize” (Analiza) przejdź do opcji „Dye Sets” (Zestawy barwników) i kliknij przycisk „Create” (Utwórz).
2. W polu „Dye Set Name” (Nazwa zestawu barwników) wprowadź nazwę, np. BT5.
3. W polu „Chemistry” (Chemia) wybierz opcję „Matrix Standard” (Wzorzec macierzy) oraz ustaw parametr „AnyDye Template” (Szablon dowolnego barwnika) opcji „dye set template” (Szablon zestawu barwników)
4. W polu „Arrange Dyes” (Rozmieść barwniki) wyłącz opcję „Purple” (Fioletowy). Upewnij się, że włączone są wszystkie pozostałe kolory.
5. W części „Calibration Peak Order” (Kolejność pików kalibracji) kolory muszą być rozmieszczone w następujący sposób: 5 – niebieski, 4 – zielony, 3 – żółty, 2 – czerwony i 1 – pomarańczowy.
6. Nie wolno zmieniać ustawień zawartych w części „Parameter” (Parametry).
7. Kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: BT5

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: AnyDye Template

Arrange Dyes

Dye Selection	Reduced Selection	Calibration Peak Order
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	0
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5

Parameters

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

Matrix Condition Number Upper Limit: 20.0

Locate Start Point: * After Scan: 300 * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 20000

Sensitivity: 0.1

* Minimum Quality Score: 0.8

Notes

Matrix Std. BT5 multi cap.

Close Save

Rysunek 2. Konfiguracja zestawu barwników BT5.

Oznaczanie serii kalibracji widmowej

Po umieszczeniu na tacy automatycznego podajnika płytek wielostudzienkowych z mieszaniną kalibracji widmowej można rozpocząć proces kalibracji widmowej.

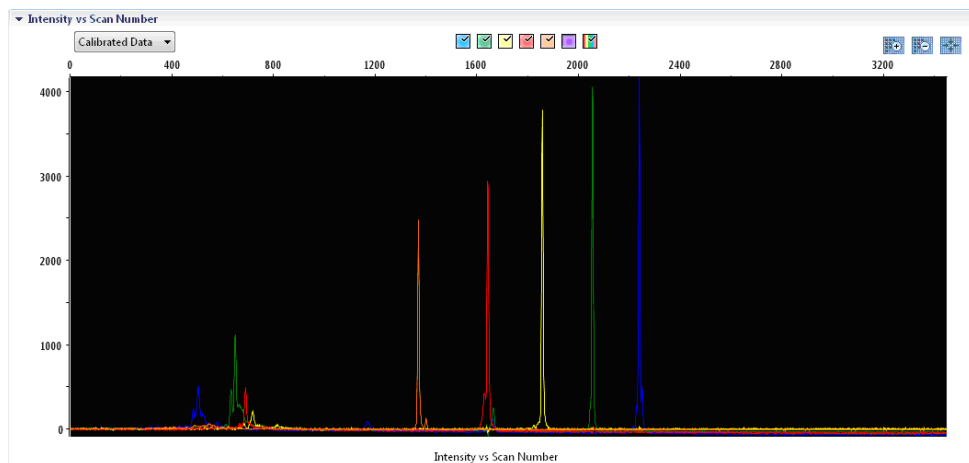
1. Aby uzyskać dostęp do ekranu Spectral Calibration (Kalibracja widmowa), wybierz opcję „Maintenance” (Konserwacja) w obrębie deski rozdzielczej oprogramowania do gromadzenia danych 3500 Series Data Collection.
2. Aby skonfigurować serię kalibracji, przejdź do części „Calibrate” (Kalibracja), a następnie do części „Spectral” (Widmowa) i wybierz opcję „Calibration Run” (Seria kalibracji).
3. Należy określić liczbę studzienek płytki kalibracji widmowej oraz pozycję w obrębie analizatora.

4. W polu „Chemistry Standard” (Wzorzec chemii) wybierz opcję „Matrix Standard” (Wzorzec macierzy), a w polu „Dye Set” (Zestaw barwników) wybierz na przykład wcześniej utworzony zestaw BT5 (w punkcie 2).
5. (Opcjonalnie) Aktywuj funkcję „Allow Borrowing” (Pozwalaj na pożyczki).
6. Kliknij przycisk „Start Run” (Rozpocznij oznaczenie).

Sprawdzanie macierzy

Kliknij kapilarę w tabeli, aby wyświetlić pod tabelą z wynikami oznaczenia wyniki dla każdej kapilary (Capillary (Kapilara), Quality value (Wartość Q) i Condition Number (Numer stanu)).

- Wartość jakości (wartość parametru Q) każdej kapilary musi być większa niż 0,8, a wartość parametru C musi zawierać się w zakresie od 1 do 20.
- Sprawdź próbki macierzy pod kątem płaskiej linii wyjściowej. Jak przedstawiono na rys. 3, w każdej próbce macierzy powinno występować 5 pików o wysokości od około 1000 do 5000 RFU (uwaga: Optymalny zakres to 2000–4000 RFU).



Rysunek 3. Elektroforegram kalibracji widmowej z wzorcem macierzy BT5 wykonanej przy użyciu analizatora genetycznego 3500 firmy Applied Biosystems.

Po pomyślnym ukończeniu procesu kalibracji widmowej w wierszu „Overall” (Ogółem) pojawiają się zielone wyniki. Jeżeli w wierszu „Overall” (Ogółem) wyświetlane są czerwone wyniki, należy zapoznać się z częścią „Spectral calibration troubleshooting” (Diagnostyka i rozwiązywanie problemów związanych z kalibracją widmową) *Instrukcji obsługi analizatorów genetycznych 3500/3500xL firmy Applied Biosystems*.

▼ Capillary Run Data

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

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 ■ Not Calibrated

Rysunek 4. Przykład pomyślniej kalibracji widmowej z wzorcem macierzy BT5 dla wszystkich kapilar analizatora genetycznego 3500 firmy Applied Biosystems.

Dla każdej kapilary wybierz i wyświetl dane widmowe i pierwotne. Sprawdź, czy dane spełniają poniższe kryteria:

- Kolejność pików na profilu widmowym od lewej do prawej jest następująca: pomarańczowy-czerwony-żółty-zielony-niebieski.
- Na profilu danych pierwotnych nie widać żadnych dodatkowych pików.
- Morfologia piku na profilu widmowym nie wykazuje żadnych dużych zachodzeń na siebie, spadków ani innych nieregularności. Powinny być widoczne oddzielne i wyraźne piki

Jeżeli dane dla wszystkich kapilar spełniają powyższe kryteria, kliknij polecenie „Accept” (Akceptuj). Jeżeli dane jakiegokolwiek kapilary nie spełniają powyższych kryteriów, kliknij polecenie „Reject” (Odrzuć) i zapoznaj się z częścią „Spectral calibration troubleshooting” (Diagnostyka i rozwiązywanie problemów związanych z kalibracją widmową) *Instrukcji obsługi analizatorów genetycznych 3500/3500xL firmy Applied Biosystems*.

Przygotowanie próbki

1. Przed otwarciem probówek należy je worteksować i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotuj mieszaninę formamidu i standardu wielkości DNA zgodnie z tabelą 28.
3. Worteksuj, a następnie krótko odwiruj mieszaninę.
4. Odmierz 12 µl porcję mieszaniny do probówki dla każdej analizowanej próbki.
5. Dodaj 1 µl produktu reakcji PCR lub drabiny alleli (w razie potrzeby po rozcieńczeniu).
6. Prowadź denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
7. Wykonaj zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.
Do ostudzenia płytki można zamiast tego użyć termocyklera ustawionego na 4°C.
8. Załaduj próbki na tacę.

Tabela 28. Przygotowanie mieszaniny formamidu i standardu wielkości DNA

Składnik	Objętość
Formamid Hi-Di	12,0 µl
Standard wielkości DNA 550 (BTO)	0,5 µl

Uwaga: Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych trzeba wpipetować przynajmniej 1 całą kolumnę (protokół z 8 próbkami) lub 3 całe kolumny (protokół z 24 próbkami). Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy wypełnić 12 µl formamidu Hi-Di.

Aby zapewnić rzetelne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy wstrzykiwać jedną drabinę alleli na każdy zestaw 24 próbek:

- Analizatory 8-kapilarne: jedna drabina alleli na 3 iniekcje
- Analizatory 24-kapilarne: jedna drabina alleli na iniekcję

Ważne: rzeczywista temperatura pomieszczenia może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w analizatorach wielokapilarnych w taki sposób, że zwłaszcza w niższych temperaturach występują piki podrzędne lub podzielone. Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta analizatora. Należy również dopilnować wyrównania parametrów buforów z warunkami otoczenia.

Konfiguracja serii oznaczeń

W przypadku używania zestawu Investigator ESSplex SE QS po raz pierwszy z analizatorem genetycznym 3500 firmy Applied Biosystems konieczne będzie najpierw skonfigurowanie kilku protokołów:

- Protokół analizatora
- Size Standard (Standard wielkości)
- QC Protocol (Protokół kontroli jakości)
- Test

Wszystkie protokoły można skonfigurować za pośrednictwem sekcji Dashboard (Deska rozdzielcza) oprogramowania gromadzenia danych 3500 Series Data Collection.

Protokół analizatora

1. Aby skonfigurować protokół analizatora, przejdź do części „Library” (Biblioteka), a następnie do części „Analyze” (Analiza) w sekcji „Instrument Protocols” (Protokoły analizatora). Kliknij przycisk „Create” (Utwórz).

Uwaga: Zmień domyślne ustawienia modułu oznaczenia z „HID36_POP4” na wskazane w tabeli 29.

2. W przypadku analizatora genetycznego 3500 firmy Applied Biosystems należy wprowadzić lub wybrać parametry z tabeli 29. W przypadku analizatora genetycznego 3500xL firmy Applied Biosystems należy wprowadzić lub wybrać parametry z tabeli 30.

3. Kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

Tabela 29. Parametry protokołu dla analizatora genetycznego 3500 firmy Applied Biosystems

Parametr	Ustawienie
Application Type (Rodzaj zastosowania)	HID
Capillary Length (Długość kapilary)	36 cm
Polymer (Polimer)	POP4
Dye Set (Zestaw barwników)	np. BT5
Run Module (Moduł oznaczenia)	HID36_POP4
Protocol Name (Nazwa protokołu)	np. Investigator ESSplex SE QS
Oven Temperature (Temperatura wypiekania) (°C)	Ustawienie domyślne (60)
Run Voltage (Napięcie oznaczenia) (kV)	13,0
PreRun Voltage (Napięcie oznaczenia wstępnego) (kV)	Ustawienie domyślne (15)
Injection Voltage (Napięcie iniekcji) (kV)	1,2
Run Time (Czas oznaczania) (s)	1550
PreRun Time (Czas oznaczania wstępnego) (s)	Ustawienie domyślne (180)
Injection Time (Czas iniekcji) (s)	30,0*
Data Delay (Opóźnienie danych) (s)	Ustawienie domyślne (1)
Advanced Options (Opcje zaawansowane)	Ustawienie domyślne

* W zależności od rodzaju próbki można odejść od ustawień standardowych i wybrać czas iniekcji od 1 do 35 sekund. W przypadku oznaczania próbek o bardzo wysokim natężeniu sygnału można wybrać krótszy czas iniekcji. W przypadku próbek o niskiej zawartości DNA może wystąpić konieczność użycia czasu iniekcji do 35 s.

Tabela 30. Parametry protokołu dla analizatora genetycznego 3500xL firmy Applied Biosystems

Parametr	Ustawienie
Application Type (Rodzaj zastosowania)	HID
Capillary Length (Długość kapilary)	36 cm
Polymer (Polimer)	POP4
Dye Set (Zestaw barwników)	np. BT5
Run Module (Moduł oznaczenia)	HID36_POP4
Protocol Name (Nazwa protokołu)	np. Investigator ESSplex SE QS
Oven Temperature (Temperatura wypiekania) (°C)	Ustawienie domyślne (60)
Run Voltage (Napięcie oznaczenia) (kV)	13,0
PreRun Voltage (Napięcie oznaczenia wstępnego) (kV)	Ustawienie domyślne (15)
Injection Voltage (Napięcie iniekcji) (kV)	1,6
Run Time (Czas oznaczania) (s)	1550
PreRun Time (Czas oznaczania wstępnego) (s)	Ustawienie domyślne (180)
Injection Time (Czas iniekcji) (s)	25,0*
Data Delay (Opóźnienie danych) (s)	Ustawienie domyślne (1)
Advanced Options (Opcje zaawansowane)	Ustawienie domyślne

* Można odejść od ustawień standardowych i wybrać czas iniekcji od 1 do 30 sekund w zależności od rodzaju próbki. W przypadku oznaczania próbek o bardzo wysokim natężeniu sygnału można wybrać krótszy czas iniekcji. W przypadku próbek o niskiej zawartości DNA może wystąpić konieczność użycia czasu iniekcji do 30 s.

Size Standard (Standard wielkości)

1. Aby skonfigurować opcję Size Standard (Standard wielkości), przejdź do części „Library” (Biblioteka), a następnie do części „Analyze” (Analiza) w sekcji „Size Standards” (Standardy wielkości) i kliknij przycisk „Create” (Utwórz).
2. Należy wprowadzić lub wybrać parametry z tabeli 30.
Standardu wielkości DNA 550 (BTO) należy używać z fragmentami o następujących długościach: 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 i 550 pz.
3. Alternatywnie należy zaimportować parametry standardu wielkości DNA 550 (BTO) przy użyciu zalecanego pliku szablonu Investigator „SST-BTO_60-500bp” (tabela 31).
4. Kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

Tabela 31. Parametry opcji standardu wielkości

Parametr	Ustawienia
Size Standard (Standard wielkości)	np. SST-BTO_60-500bp
Dye Color (Kolor barwnika)	Pomarańczowy

QC Protocol (Protokół kontroli jakości)

1. Aby skonfigurować opcję QC Protocol (Protokół kontroli jakości), przejdź do części „Library” (Biblioteka), a następnie do części „Analyze” (Analiza) w sekcji „QC Protocols” (Protokoły kontroli jakości) i kliknij przycisk „Create” (Utwórz).
2. Należy wprowadzić lub wybrać parametry z tabeli 32.

Tabela 32. Parametry protokołu kontroli jakości

Parametr	Ustawienia
Protocol Name (Nazwa protokołu)	np. BTO_550
Size Standard (Standard wielkości)	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

3. Przejdź do części „Analysis Settings” (Ustawienia analizy), a następnie do sekcji „Peak Amplitude Threshold” (Wartość progowa amplitudy piku) i wyłącz opcję „Purple” (Fioletowy). Upewnij się, że włączone są wszystkie pozostałe kolory. Sprawdź zalecane ustawienia analizy zawarte w tabeli 35 na stronie 51. Wszystkie pozostałe ustawienia powinny pozostać zgodne z ustawieniami domyślnymi.
4. Kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

Test

1. Aby skonfigurować test, przejdź do części „Library” (Biblioteka) w sekcji „Manage” (Zarządzanie). Wybierz element „Assays” (Testy) i kliknij przycisk „Create” (Utwórz).
Aby analizować fragmenty zestawu Investigator ESSplex SE QS, konieczne jest wybranie parametrów w tabeli 33.
2. Kliknij przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

Tabela 33. Parametry testu

Parametr	Ustawienia
Nazwa oznaczenia	np. Investigator ESSplex SE QS
Kolor	Ustawienie domyślne
Application Type (Rodzaj zastosowania)	HID
Protokół analizatora	np. Investigator ESSplex SE QS
QC Protocols (Protokoły kontroli jakości)	np. BTO_550

Uruchamianie wirowania

1. W obrębie deski rozdzielczej kliknij polecenie „Create New Plate” (Utwórz nową płytkę).
2. Przejdź do części „Setup” (Konfiguracja), a następnie do sekcji „Define Plate Properties” (Definiowanie właściwości płytki) i wybierz opcję „Plate Details” (Szczegóły płytki). Wybierz lub wprowadź informacje zawarte w tabeli 34.

Tabela 34. Plate properties (Właściwości płytki)

Parametr	Ustawienia
Name (Nazwa)	np. Investigator ESSplex SE QS
Number of Wells (Liczba studzienek)	96
Plate Type (Rodzaj płytki)	HID
Capillary Length (Długość kapilary)	36 cm
Polymer (Polimer)	POP4

3. Kliknij przycisk „Assign Plate Contents” (Przypisz zawartość płytki), aby potwierdzić wprowadzone zmiany.
4. Wprowadź wyznaczoną nazwę próbki do każdej studzienki zawierającej próbkę lub drabinę alleli. Zidentyfikuje to pozycje studzienek z wszystkimi próbkami do gromadzenia i przetwarzania danych.
5. W części „Assay” (Test) wybierz odpowiedni test do przeprowadzenia analizy. Jeżeli wykonano wszystkie czynności z części „Konfiguracja serii oznaczeń”, kliknij przycisk „Add from Library” (Dodaj z biblioteki) i wybierz protokół Investigator ESSplex SE QS jako protokół analizatora (Instrument Protocol). Należy przypisać test wszystkim nazwanym studzienkom na płytce.
6. Powtórz opisane czynności w odniesieniu do opcji „File name conventions” (Konwencje nazw plików) oraz „Results group” (Grupa wyników).
7. Wybierz studzienki, dla których chcesz określić test. Zaznacz pola obok nazw sekcji „Assay” (Test), „File name conventions” (Konwencje nazw plików) i „Results group” (Grupa wyników), aby je przypisać do wybranych studzienek.
8. Jeżeli jeszcze tego nie wykonano, załaduj złożoną płytkę do analizatora i zamknij drzwiczki analizatora, aby go ponownie zainicjować. Następnie kliknij polecenie „Link Plate for Run” (Powiąz płytke do oznaczenia). Na kolejnym ekranie wprowadź żadaną nazwę serii oznaczenia (Run Name) i kliknij przycisk „Start Run” (Rozpocznij oznaczenie).

Parametry/metoda analizy

W tabeli 35 wymieniono zalecane parametry analizy dla karty Peak Detector (Detektor pików).

Tabela 35. Zalecane ustawienia dla analizatora genetycznego 3500/3500xL firmy Applied Biosystems

Parametr	Ustawienia
Peak Detection Algorithm (Algorytm wykrywania pików)	Advanced (Zaawansowany)
Zakresy	Analysis (Analiza): Partial Range (Zakres częściowy) Start Point (Punkt początkowy): 1000; Stop Point (Punkt końcowy): 20 000 Sizing (Rozmiar): All Sizes (Wszystkie rozmiary)
Smoothing (Wygladzanie) i Baseline (Linia bazowa)	Smoothing (Wygladzanie): Light (Lekkie) Baseline Window (Okno wyjściowe): 51 punkty
Size Calling Method (Metoda określania rozmiaru)	Lokalna metoda Southerna
Peak Detection (Wykrywanie pików)	Peak Amplitude Thresholds (Wartości progowe amplitudy piku) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. szerokość połówkowa piku): 2 punkty Polynomial Degree (Stopień wielomianu): 3 Peak Window Size (Rozmiar okna piku): 11 punktów [†] Próg testu: 0,0

* Wartość progowa (graniczna) amplitudy piku odpowiada minimalnej wysokości piku, jaka będzie wykrywana przez oprogramowanie GeneMapper ID-X. Wartości progowe na ogół zawierają się w zakresie od 50 do 200 RFU i każde laboratorium powinno je ustalić indywidualnie.

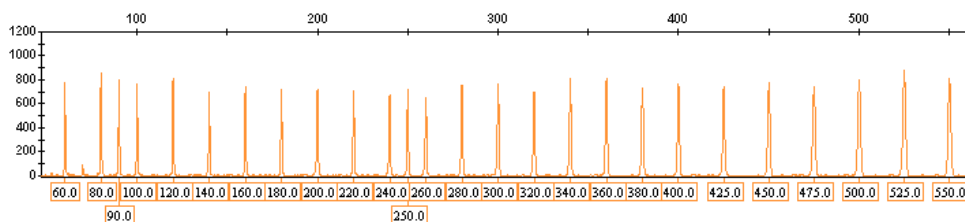
Zalecenie: Minimalna wysokość piku powinna być 3 razy większa od szumu tła linii bazowej.

[†] Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna piku) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

Protokół: Analiza

Ogólne instrukcje dotyczące automatycznej analizy próbek zawierają odpowiednie instrukcje obsługi oprogramowania GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X*.

Znalezienie dokładnych długości amplifikowanych produktów zależy od rodzaju urządzenia, warunków elektroforezy oraz użytego standardu wielkości DNA. Z powodu złożoności niektórych loci określenie wielkości należy opierać o równomiernie rozłożone elementy referencyjne. Standardu wielkości DNA 550 (BTO, rys. 5) należy używać z fragmentami o następujących długościach: 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 i 550 pz.



Rysunek 5. Elektroforegram standardu wielkości DNA 550 (BTO), fragmenty z długościami wyrażonymi w pz (par zasad).

Oprogramowanie do analizy

Przydział alleli należy wykonywać za pomocą odpowiedniego oprogramowania analitycznego, np. GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X* w połączeniu z plikami szablonów Investigator, które można pobrać ze strony **www.qiagen.com**; patrz tabela 36 i tabela 37.

Tabela 36. Zalecane pliki szablonów Investigator dla analizatora GeneMapper ID

Typ pliku	Nazwa pliku
Panele	ESSplex_SE_QS_Panels
Zestawy kontenerów	ESSplex_SE_QS_Bins
Standard wielkości	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Metoda analizy)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu
Ustawienia wykresu	Plots_5dyes

Zawsze należy używać plików paneli i zestawów kontenerów; inne pliki szablonów są opcjonalne.

Tabela 37. Zalecane pliki szablonów Investigator dla analizatora GeneMapper ID-X

Typ pliku	Nazwa pliku
Panele	ESSplex_SE_QS_Panels_x
Zestawy kontenerów	ESSplex_SE_QS_Bins_x
Piki satelitarne (Stutter)	ESSplex_SE_QS_Stutter_x
Standard wielkości	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Metoda analizy)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Ustawienia wykresu	Plots_5dyes

Zawsze należy używać plików paneli i zestawów kontenerów; inne pliki szablonów są opcjonalne.

Kontrola

Allele podane w tabeli 38 reprezentują kontrolne DNA 9948 (zawarte w zestawie ESSplex SE QS) oraz DNA z innych dostępnych w handlu standardowych linii komórkowych.

Tabela 38. Przypisanie alleli dla zestawu Investigator ESSplex SE QS

Locus	CCR 9948	CCR 9947A
Amelogenina	X/Y	X/X
D1S1656	14/17	18,3/18,3
D2S441	11/12	10/14
D2S1338	23/23	19/23
D3S1358	15/17	14/15
D8S1179	12/13	13/13
D10S1248	12/15	13/15
D12S391	18/24	18/20
D16S539	11/11	11/12
D18S51	15/18	15/19
D19S433	13/14	14/15
D21S11	29/30	30/30
D22S1045	16/18	11/14
FGA	24/26	23/24
SE33	23,2/26,2	19/29,2
THO1	6/9,3	8/9,3
vWA	17/17	17/18

W celu dodatkowego potwierdzenia w powyższej tabeli przedstawiono allele referencyjnego DNA nabytego od firmy Coriell Cell Repositories (CCR) oraz 3 nabytych od firm CCR i ATCC referencyjnych DNA zgodnych ze standardem opisanym przez Szibor et al. (2003).

Czujnik jakości

Zestaw Investigator ESSplex SE QS zawiera dwie wewnętrzne kontrole PCR (czujnik jakości QS1 i QS2) zapewniające przydatne informacje dotyczące ogólnej sprawności amplifikacji w toku reakcji PCR oraz występowania inhibitorów reakcji PCR. Wewnętrzne czujniki jakości uwzględniono w mieszaniu primerów i podlegają amplifikacji jednocześnie z polimorficznymi znacznikami STR. Czujniki jakości wyznakowano FAM i pojawiają się we fragmentach w rozmiarze 71 bpz (QS1) i 435 bpz (QS2).

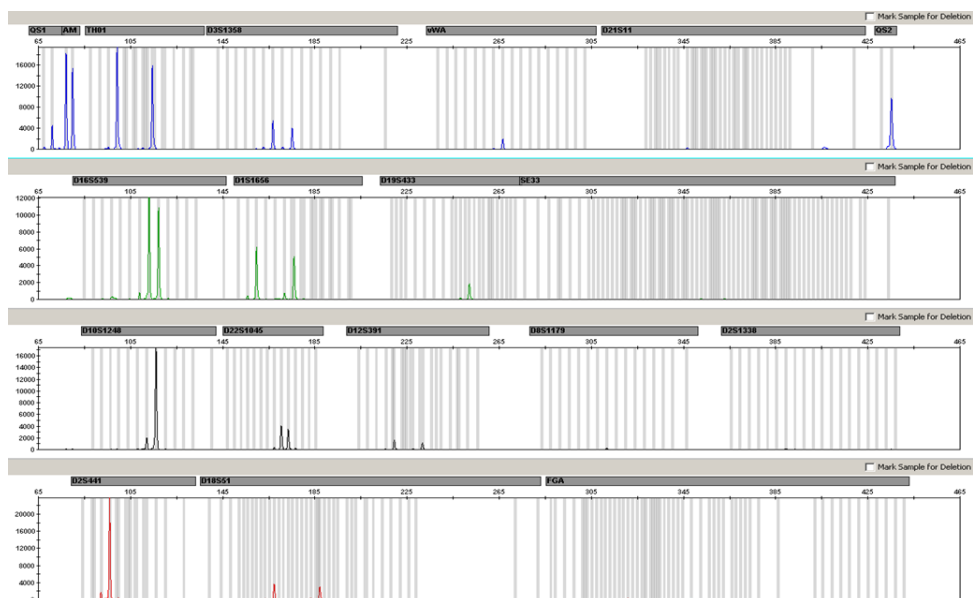
Aby rozwiązać problem podobieństwa sekwencji oraz możliwości nieswoistego wiązania, z użyciem algorytmu losowego zaprojektowano syntetyczny szablon DNA kontroli wewnętrznej. Sekwencja szablonu różni się od wszystkich znanych sekwencji DNA i w szczególności nie wykazuje jakiegokolwiek podobieństwa do ludzkiego DNA. W związku z tym możliwość nieswoistego wiązania w kontekście reakcji amplifikacji w multipleksowym PCR jest bardzo niska.

Zasadniczo pomyślna amplifikacja małego czujnika jakości (QS1) wskazuje, że prawidłowo przygotowano i przeprowadzono reakcję PCR, niezależnie od tego, czy w próbce występowało DNA. Jeżeli podczas analizy produktów amplifikacji nie zostanie wykryty żaden czujnik jakości, oznacza to, że nieprawidłowo przeprowadzono pipetowanie składników reakcji PCR lub nieprawidłowo przeprowadzono samą reakcję PCR. Wskazuje to, że użytkownik powinien powtórzyć eksperyment z zachowaniem większej ostrożności podczas etapu przygotowywania, aby móc uzyskać prawidłowe wyniki.

Eksperymenty dotyczące czułości wykazały, że kontrole wewnętrzne nie mają żadnego wpływu na wydajność reakcji PCR. Amplifikacja niskich ilości szablونowego DNA dała podobne wyniki w przypadku mieszanin primerów z czujnikami jakości i bez nich.

Ponadto analiza dwóch fragmentów kontroli wewnętrznej, QS1 i QS2 oraz docelowych produktów amplifikacji STR umożliwia różnicowe identyfikowanie obecności inhibitorów lub obecności rozkładu DNA w reakcji amplifikacji.

W przypadku degradacji próbki amplifikacja mniejszych fragmentów docelowych jest wydajniejsza od amplifikacji większych fragmentów docelowych. Jednakże degradacja docelowego szablonu nie zagraża amplifikacji fragmentów kontroli wewnętrznej z szablonu kontroli wewnętrznej (rys. 6). W związku z tym równa proporcja QS1 i QS2 razem z proporcją przesuniętą na rzecz małych docelowych produktów STR sugeruje występowanie degradacji próbki.

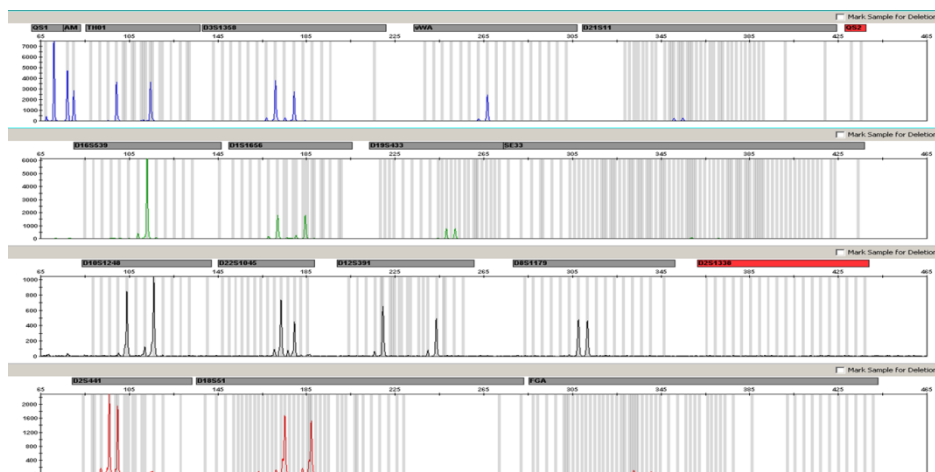


Rysunek 6. Elektroforegram analizy STR w obecności degradowanego DNA (fragmenty po 150 pz).

Genomowe DNA pocięto ultradźwiękami na fragmenty po 150 pz. Duże fragmenty STR amplifikowano z bardzo niskim wynikiem reakcji PCR, lecz fragmenty QS1 i QS2 amplifikowano normalnie z równymi wysokościami pików. U góry elektroforegramu przedstawiono markery. Czujniki jakości wyznakowano FAM (panel 1) i pojawiają się we fragmentach w rozmiarze 71 pz (QS1) i 435 pz (QS2).

Jeżeli w próbce występują inhibitory, takie jak hematyna i kwas humusowy, amplifikacja jest mniej wydajna i dłuższe fragmenty DNA podlegają amplifikacji w mniejszym stopniu od krótszych fragmentów. Jeżeli analiza produktów amplifikacji wskazuje na niską wydajność amplifikacji dłuższych sekwencji docelowych STR oraz dłuższego fragmentu czujnika jakości (QS2), lecz amplifikacja krótszego czujnika jakości (QS1) odbywa się pomyślnie,

prawdopodobnie próbka uległa skażeniu inhibitorami. Oznacza to, że przesunięcie proporcji na rzecz krótkiego czujnika jakości (QS1) sugeruje obecność inhibitorów (rys. 7).



Rysunek 7. Elektroforegram analizy STR w obecności hematyny. W obecności 1000 μ M hematyny przeprowadzono amplifikację 16 markerów STR, amelogenu i dwóch czujników jakości, wyniki następnie poddano analizie przy użyciu elektroforezy kapilarnej. Amplifikacja fragmentów o wysokiej masie cząsteczkowej, w tym markerów STR zawierających więcej niż 250 pz oraz QS2 podlegała hamowaniu przez wysoką zawartość hematyny. U góry elektroforegramu przedstawiono markery. Czujniki jakości wyznakowano FAM (panel 1) i pojawiają się we fragmentach w rozmiarze 71 pz (QS1) i 435 pz (QS2 niewidoczne).

Analiza obecności dwóch czujników jakości pozwala użytkownikowi różnicowo identyfikować obecność inhibitorów reakcji PCR lub występowanie degradacji w obrębie próbki medycyny sądowej. Zapewnia to użytkownikowi przydatne informacje pozwalające interpretować dane oraz planować następne czynności. W tabeli 39 przedstawiono zestawienie możliwych wyglądnów profili oraz ich znaczenie.

Tabela 39. Wyglądy profili oraz ich znaczenie

Piki alleli	QS1	QS2	Interpretacja
Występują	Występują	Występują	Profil prawidłowy
Brak	Występują	Występują	Brak DNA
Brak	Brak	Brak	Niepowodzenie reakcji PCR
Profil stoku górskiego	Występują	Spadek	Występują inhibitory
Profil stoku górskiego	Występują	Występują	Degradacja DNA

Uwaga: Wysokość pików QS1 i QS2 może się lekko różnić w różnych eksperymentach. Niewielki rozrzut wysokości pików to normalne zjawisko i nie zależy od wpływu inhibitorów. Podczas procedury walidacji analityk powinien ocenić zwykłą zmienność widmową w odniesieniu do określonych rodzajów próbek i zdefiniować standardowy zakres wysokości pików dla obu czujników QS.

Spadek sygnału czujnika QS2 poniżej 20% wartości sygnału czujnika QS1 wskazuje na hamowanie reakcji PCR.

Allele

W tabeli 40 przedstawiono allele drabiny alleli. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu polimeru POP-4 (tabela 40 i rys. 8). Używanie różnych analizatorów, standardów wielkości DNA lub polimerów może skutkować otrzymywaniem fragmentów o różnej długości. Ponadto zaleca się przeprowadzić wzrokowe porównanie z drabiną alleli.

Skalowanie

- Poziome: 65–465 pz
- Pionowe: W zależności od natężenia sygnału

Tabela 40. Fragmenty drabiny alleli zawarte w zestawie Investigator ESSplex SE QS

Locus	Znacznik barwnika	Numery powtórzeń drabiny alleli
QS1	6-FAM	S, Q
Amelogenina	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,3, 10, 10,3, 11, 13, 13,3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	6-FAM	24, 24,2, 25, 26, 26,2, 27, 28, 28,2, 29, 29,2, 30, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 35,2, 36, 36,2, 37, 38
QS2	6-FAM	Q, S
D16S539	BTG	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D1S1656	BTG	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,3, 15, 15,3, 16, 16,3, 17, 17,3, 18, 18,3, 19,3, 20,3
D19S433	BTG	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
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
D12S391	BTY	14, 15, 16, 17, 17,3, 18, 18,3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
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	BTR	8, 9, 10, 11, 11,3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR	8, 9, 10, 10,2, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 16, 17, 17,2, 18, 18,2, 19, 20, 21, 21,2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
FGA	BTR	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, 31,2, 33, 34, 37,2, 42,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2, 47,2, 48,2, 50,2, 51,2

* Dla lepszej orientacji wyróżniono allele w obrębie drabiny alleli.

Przewodnik rozwiązywania problemów

Przewodnik może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy w dziale serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na pytania dotyczące danych i/lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii badań i oznaczania próbek (informacje kontaktowe znajdują się na stronie www.qiagen.com).

Komentarze i propozycje

Nie zrównoważone profile, niskie natężenie sygnałów

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Nieprawidłowa objętość szybkiej mieszaniny reakcyjnej lub mieszaniny primerów | Sprawdzić przygotowanie reakcji i powtórzyć amplifikację. |
| b) | Przed dystrybucją nie wykonano worteksowania mieszaniny głównej | Dokładnie worteksować mieszaninę główną i krótko ją odwirować. |

Wysokość pików QS1 i/lub spadków QS2 w eksperymentach z zastosowaniem standardów

Niewielki rozrzut wysokości pików czujników jakości to normalne zjawisko i nie zależy od wpływu inhibitorów.

Podczas procedury walidacji analityk powinien ocenić zwykłą zmienność widmową w odniesieniu do określonych rodzajów próbek i zdefiniować standardowy zakres wysokości pików dla obu czujników QS. Spadek sygnału czujnika QS2 poniżej 20% wartości sygnału czujnika QS1 wskazuje na hamowanie reakcji PCR.

Przygotowanie próbki

Należy zwiększyć natężenie sygnału próbki

Zmniejsz objętość standardu wielkości DNA 550 (BTO) do wysokości pików na poziomie około 500 RFU.

Oczyść produkty reakcji PCR przed rozpoczęciem analizy. Zaleca się używać zestawu do oczyszczania MinElute® PCR Purification (QIAGEN, numery kat. 28004 i 28006), który gwarantuje szybkie i skuteczne oczyszczanie.

Komentarze i propozycje

Nieodpowiednia macierz/kalibracja widmowa

Przy użyciu bieżącej macierzy/kalibracji widmowej pomiędzy panelami barwników (B, G, Y, R i O czyli niebieski, zielony, żółty, czerwony i pomarańczowy) występuje przenikanie się pików.

Nie można używać tej macierzy do analizy. Powtórz kalibrację widmową/generowanie macierzy. Należy dokładnie przestrzegać prawidłowego protokołu konkretnego analizatora.

Wiele pików jest oznaczanych w próbkach jako allele spoza drabiny (OL)

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Nie przeprowadzono prawidłowego zdefiniowania lub zidentyfikowania standardu wielkości DNA 550 (BTO) | Kliknij pomarańczową ikonę „Size Match Editor” (Edytor dopasowania wielkości) na górnym pasku narzędzi oprogramowania GeneMapper <i>ID</i> lub GeneMapper <i>ID-X</i> . Oznacz pomarańczowe fragmenty we wszystkich próbkach.

Do zestawów reakcji PCR identyfikacji ludzkich próbek Investigator Human Identification PCR należy zawsze stosować standard wielkości DNA 550. |
| b) | Za wysokie natężenia sygnału. Jeżeli wysokości pików próbek wykraczają poza liniowy zakres wykrywania (>5000 RFU/ >20000 RFU)*, może dojść do zwiększenia częstotliwości pików satelitarnych, podzielonych pików i artefaktów. | Zredukuj etapami czas iniekcji do minimum 1 sekundy, zredukuj ilość produktu amplifikacji PCR do analizy lub zredukuj ilość DNA do reakcji PCR. |
| c) | Pęcherzyki w kapilarze powodują powstawanie przenikania pików w obrębie wszystkich paneli kolorystycznych („skoki”), które skutkują niewłaściwym określeniem alleli. | Powtórz elektroforezę w celu potwierdzenia wyników. Sprawdź maksymalną liczbę iniekcji zalecaną przez producenta analizatora. W razie potrzeby przygotuj nową matrycę kapilar. |
| d) | Różnice w wydajności oznaczenia pomiędzy kapilarami analizatora wielokapilarnego mogą skutkować przesunięciem przypisywania alleli. | Aby zapewnić rzetelne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin alleli. |

Komentarze i propozycje

- | | |
|--|---|
| e) Niska temperatura w pomieszczeniu albo niska temperatura bufora CE może skutkować przesunięciami migracyjnymi fragmentów lub pikami OL. | Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta analizatora. Należy dopilnować wyrównania parametrów buforów z warunkami otoczenia. Producent analizatora zaleca wstępne ogrzanie analizatora CE (przez ~30 minut). |
|--|---|

* >5000 RFU dla analizatora genetycznego 3100 i 3130; >20 000 RFU dla analizatora genetycznego 3500 firmy Applied Biosystems.

Niewłaściwa iniekcja/plik drabiny alleli

- | | |
|---|---|
| a) Dla drabiny alleli można zidentyfikować jako pik dodatkowy sygnał z powodu zaburzeń podczas elektroforezy. W razie niewłaściwego przypisania pików drabiny alleli nie można jej używać do analizy. | Należy użyć innej iniekcji/pliku drabiny alleli i sprawdzić dane analizowanych wielkości przy użyciu standardu wielkości (w pz) drabiny alleli.

Do zestawów reakcji PCR identyfikacji ludzkich próbek Investigator Human Identification PCR należy zawsze stosować standard wielkości DNA 550. |
| b) Jeden z pików drabiny alleli ma intensywność poniżej wartości wykrywania pików (50–200 RFU) użytej metody analitycznej i w związku z tym nie został zidentyfikowany. | Drabinę alleli należy załadować do analizatora w stężeniu wyższym od analizowanych próbek.

Alternatywnie można analizować dane drabiny alleli przy użyciu w oprogramowaniu analitycznym niższej wartości wykrywania pików. |
| c) Nie zidentyfikowano jednego pików drabiny alleli, ponieważ wykracza on poza oczekiwany zakres wielkości w oprogramowaniu (w bp). | Porównaj długość fragmentów (w pz) pierwszego allelu drabiny alleli w jednym kolorze z odpowiadającą wartością kategorii. Następnie porównaj ją z wartością pozostałych alleli. |
| d) Nie znaleziono alleli punktowych | Allele punktowe to allele różniące się o przynajmniej 1 pz od następnego allela całkowitego. Sprawdź ustawienia metody analitycznej. Zmniejsz wartość parametru Peak Window Size (Rozmiar okna pików) do 11 punktów. |
| e) Różnice w wydajności oznaczenia pomiędzy kapilarami analizatora wielokapilarnego mogą skutkować przesunięciem przypisywania alleli. | Aby zapewnić rzetelne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin alleli. |

Literatura

Firma QIAGEN udostępnia obszerną, aktualną bazę danych online publikacji naukowych, w których stosowane są produkty QIAGEN. Zaawansowane opcje wyszukiwania umożliwiają znajdowanie potrzebnych artykułów według słów kluczowych lub zastosowań, obszarów badań, tytułów itp.

W celu uzyskania pełnej listy dokumentów referencyjnych należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN.

Cytowane odniesienia do literatury

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175.
2. Hill, C.R., Kline, M.C., Coble, M.D., and Butler, J.M. (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.*, **53**, 73.
3. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

Załącznik: interpretacja wyników

Wykonanie analizy i automatycznego przypisania alleli po wykonaniu PCR przy użyciu odpowiedniego oprogramowania analitycznego stanowi gwarancję precyzyjnego i rzetelnego oznaczania alleli.

Ogólna procedura analizy

1. Sprawdzenie standardu wielkości DNA.
2. Sprawdzenie drabiny alleli.
3. Sprawdzenie kontroli pozytywnej.
4. Sprawdzenie kontroli negatywnej.
5. Analiza i interpretacja danych próbek.

Przenikania pików

Przenikanie pików może występować, jeżeli wysokości pików wykraczają poza liniowy zakres wykrywania (patrz część „Poradnik diagnostyki i rozwiązywania problemów”, strona 61) lub jeżeli zastosowano niewłaściwą macierz. Przenikające się piki występują w pozycjach swoistych pików w innych kanałach kolorów, na ogół z niższym natężeniem sygnału. Aby zapobiec występowaniu przenikania, wysokość pików nie powinna przekraczać wartości progowych.

Piki satelitarne

Występowanie pików satelitarnych zależy od sekwencji struktury powtórzenia oraz od liczby alleli. Piki $n-4$ są wywoływane utratą jednostki powtórzenia podczas amplifikacji czteronukleotydowych motywów STR, która wynika z efektu poślizgu polimerazy DNA *Taq*, natomiast piki $n-3$ pojawiają się zwłaszcza podczas amplifikacji trójnukleotydowego motywu STR D22S1045. Te piki należy interpretować przy użyciu plików szablonów Investigator dla oprogramowania GeneMapper *ID* i GeneMapper *ID-X*.

Dodanie nukleotydów niezależne od szablону

Z powodu swojej aktywności terminalnej transferazy, polimeraza DNA *Taq* może powodować niepełną adenylację końca 3' amplifikowanych fragmentów DNA. Pik artefaktowy jest niższy od oczekiwanego o jedną zasadę (piki -1). Wszystkie primery zawarte w zestawie Investigator ESSplex SE QS zaprojektowano z myślą o zminimalizowaniu występowania takich artefaktów. Wysokość pików artefaktowych koreluje z ilością DNA. Laboratoria powinny zdefiniować własne wartości graniczne do analizy pików.

Artefakty

Temperatura pomieszczenia może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w analizatorach wielokapilarnych w taki sposób, że występują piki podrzędne lub podzielone. W razie wystąpienia pików podrzędnych lub podzielonych zaleca się ponownie przeprowadzić iniekcję próbki.

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Investigator ESSplex SE QS Kit (100)	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix 2.0 zawierająca polimerazę DNA <i>Taq</i> , DNA kontrolne, drabinę alleli ESSplex SE QS, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz wodę niezawierającą nukleaz	381575
Investigator ESSplex SE QS Kit (400)	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix 2.0 zawierająca polimerazę DNA <i>Taq</i> , DNA kontrolne, drabinę alleli ESSplex SE QS, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz wodę niezawierającą nukleaz	381577
Powiązany produkt		
Matrix Standard BT5 multi cap. (25)	Wzorzec macierzy 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO	386123
Matrix Standard BT5 multi cap. (50)	Wzorzec macierzy 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO	386125
Zestawy Investigator do reakcji PCR identyfikacji materiału ludzkiego		
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix 2.0, DNA kontrolne, drabina alleli 24plex, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz woda niezawierająca nukleaz	382415
Investigator 24plex GO! Kit (200)*	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix 2.0, DNA kontrolne, drabina alleli 24plex, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz woda niezawierająca nukleaz	382426

* Dostępne są większe zestawy, prosimy o przesyłanie zapytań.

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Investigator ESSplex Plus Kit (100)*	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix zawierająca polimerazę DNA HotStarTaq® Plus, DNA kontrolne, drabinę alleli ESSplex Plus, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz wodę niezawierającą nukleaz	381535
Investigator ESSplex SE Plus Kit (100)*	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix zawierająca polimerazę DNA HotStarTaq Plus, DNA kontrolne, drabinę alleli ESSplex SE Plus, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz wodę niezawierającą nukleaz	381545
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Mieszanina primerów, szybka mieszanina reakcyjna Fast Reaction Mix zawierająca polimerazę DNA HotStarTaq Plus, DNA kontrolne, drabinę alleli IDplex Plus, standard wielkości DNA 550 (BTO) oraz wodę niezawierającą nukleaz	381625
Investigator HDplex Kit (100)	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	381215
Investigator Triplex AFS QS Kit (400)	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	380317
Investigator Triplex DSF Kit (400)	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	380327
Investigator Argus X-12 Kit (25)*	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	383213

* Dostępne są większe zestawy, prosimy o przesyłanie zapytań.

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Investigator Argus Y-12 QS Kit (100)	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	383615
Investigator DIPplex Kit (100)*	Mieszanina primerów, mieszanina reakcyjna, DNA kontrolne, drabina alleli, standard wielkości DNA oraz woda niezawierająca nukleaz	384015
Investigator Quantiplex HYres Kit (200)	Mieszanina reakcyjna Reaction Mix FQ, mieszanina primerów IC YQ, DNA kontrolne Z1, bufor do rozcieńczania kwasów nukleinowych QuantiTect®	387116
Investigator Quantiplex Kit (200)	Mieszanina reakcyjna Reaction Mix IC FQ, mieszanina primerów IC YQ, DNA kontrolne Z1, bufor do rozcieńczania kwasów nukleinowych QuantiTect	387016
Ekstrakcja i oczyszczanie DNA		
QIAamp® DNA Investigator Kit (50)	50 kolumn QIAamp MinElute, proteinaza K, RNA nośnikowe, bufony, próbki na próbki (2 ml)	56504
MinElute Reaction Cleanup Kit (50)*	50 kolumn MinElute Spin, bufony, próbki na próbki (2 ml)	28004
Rotor-Gene® Q		
Rotor-Gene Q 2plex	2-kanałowy aparat do PCR w czasie rzeczywistym, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji naprawy obejmującej części i robociznę	Na zamówienie

* Dostępne są większe zestawy, prosimy o przesłanie zapytań.

Produkt	Spis treści	Nr kat.
Rotor-Gene Q 2plex HRM®	Aparat do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM, 2-kanalowy z kanałem HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji naprawy obejmującej części i robociznę	Na żądanie
Rotor-Gene Q 5plex	Aparat do PCR, 5-kanalowy (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji naprawy obejmującej części i robociznę	Na żądanie
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Aparat do PCR w czasie rzeczywistym z analizatorem HRM, 5-kanalowy z kanałem HRM, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji naprawy obejmującej części i robociznę	Na żądanie
Rotor-Gene Q 6plex	Aparat do PCR, 6-kanalowy, laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1 rok gwarancji naprawy obejmującej części i robociznę	Na żądanie

Aktualne informacje licencyjne oraz wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie **www.qiagen.com**. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, HotStarTaq®, HRM®, Investigator®, Making improvements in life possible®, MinElute®, QuantiTect®, Rotor-Gene® (grupa QIAGEN); 3500®, ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avanti®, 6-FAM®, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Hi-Di®, POP-4® (Life Technologies Corporation); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (US Department of Health and Human Services). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

Ograniczona umowa licencyjna dla zestawu Investigator ESSplex SE QS

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Ten produkt może być stosowany wyłącznie zgodnie z wytycznymi dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie z elementami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem elementów opisanych w wytycznych dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych wytycznych dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe wytyczne zostały sformułowane przez użytkowników usług QIAGEN z myślą o innych użytkownikach usług QIAGEN. Te wytyczne nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw innych podmiotów.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie są przeznaczone do ponownego użycia, regeneracji ani odsprzedaży.
4. Poza wyraźnie określonymi licencjami firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyraźnych ani dorozumianych.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań mogących doprowadzić do opisanych wyżej czynności zabronionych lub ich umożliwienia. Firma QIAGEN może wnosić roszczenia wynikające z niniejszej Umowy ograniczonej licencji do dowolnego sądu i będzie rościć prawa do zwrotu wszelkich kosztów postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub praw własności intelektualnej w zakresie zestawu i/lub jego elementów.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są w witrynie www.qiagen.com.

1095534PL HB-1963-001 06/2015 © 2015

Składanie zamówień www.qiagen.com/contact | Pomoc techniczna support.qiagen.com |
Strona WWW www.qiagen.com