

## **Manuale Investigator Hexaplex ESS**

Per l'amplificazione multiplex di cinque nuovi marker europei miniSTR raccomandati da ENFSI e EDNAP, più TH01 e Amelogenina



## **Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN**

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

### **QIAGEN definisce gli standard:**

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitate il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Indice

<b>Contenuto del kit</b>	<b>4</b>
<b>Conservazione</b>	<b>4</b>
<b>Limitazioni all'uso del prodotto</b>	<b>4</b>
<b>Garanzia del prodotto e soddisfazione</b>	<b>5</b>
<b>Assistenza tecnica</b>	<b>5</b>
<b>Controllo di qualità</b>	<b>5</b>
<b>Informazioni di sicurezza</b>	<b>6</b>
<b>Introduzione</b>	<b>7</b>
<b>Materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti</b>	<b>9</b>
<b>Protocolli</b>	
■ <b>Amplificazione mediante PCR</b>	<b>10</b>
■ <b>Elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 310</b>	<b>13</b>
■ <b>Elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 3100-Avant/3100</b>	<b>22</b>
■ <b>Elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 3130/3130xl</b>	<b>32</b>
■ <b>Analisi</b>	<b>45</b>
<b>Interpretazione dei risultati</b>	<b>55</b>
<b>Guida alla risoluzione dei problemi</b>	<b>57</b>
<b>Riferimenti bibliografici</b>	<b>59</b>
<b>Informazioni per gli ordini</b>	<b>60</b>

## Contenuto del kit

<b>Kit Investigator Hexaplex ESS</b>	<b>(100)</b>	<b>(400)</b>
<b>N° catalogo</b>	<b>380615</b>	<b>380617</b>
<b>Numero di reazioni 25 <math>\mu</math>l</b>	<b>100</b>	<b>400</b>
Miscela di reazione A	500 $\mu$ l	2 x 1 ml
Miscela Primer Hexaplex ESS	250 $\mu$ l	4 x 250 $\mu$ l
Multi Taq2 DNA Polimerasi	100 U	400 U
DNA di controllo XY13 (2 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
DNA size standard 550 (BTO)	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Ladder allelico Hexaplex ESS	25 $\mu$ l	4 x 25 $\mu$ l
Acqua Nuclease-Free	2 x 1,9 ml	5 x 1,9 ml
Manuale	1	1

## Conservazione

Tutti i componenti del kit Investigator Hexaplex ESS vanno conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. La miscela primer e il ladder allelico devono essere conservati al riparo dalla luce. I campioni di DNA e i reagenti post-PCR (ladder allelico e DNA size standard) vanno conservati separatamente dai reagenti PCR. In queste condizioni, i componenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit.

## Limitazioni all'uso del prodotto

Il kit Investigator Hexaplex ESS è destinato ad applicazioni di biologia molecolare nelle analisi di medicina legale, identità umana e paternità. Il presente prodotto non è destinato a diagnosi, prevenzione o trattamento di malattie.

Prestare la massima attenzione durante la manipolazione dei prodotti. Consigliamo a tutti gli utenti di prodotti QIAGEN di attenersi alle direttive NIH sviluppate per gli esperimenti con DNA ricombinante o ad altre linee guida applicabili.

## Garanzia del prodotto e soddisfazione

QIAGEN garantisce le prestazioni di tutti i prodotti conformemente a quanto descritto nella documentazione relativa. L'acquirente deve stabilire l'adeguatezza del prodotto all'uso previsto. Qualora il prodotto non funzioni in maniera soddisfacente per motivi non associati ad un errato utilizzo, QIAGEN provvederà alla sostituzione gratuita o al rimborso del prezzo di acquisto. Ci riserviamo il diritto di apportare modifiche a qualunque prodotto allo scopo di migliorarne le prestazioni e il design. Qualora un prodotto QIAGEN non soddisfi le proprie esigenze, è possibile contattare il reparto di assistenza tecnica o il distributore locale. Provvederemo ad accreditare l'importo sul vostro conto o a sostituire il prodotto, a seconda della modalità da voi preferita. Condizioni diverse si applicano a strumenti scientifici QIAGEN, servizi e prodotti forniti in ghiaccio secco. Consigliamo di chiedere maggiori informazioni.

Su richiesta è possibile ottenere una copia dei termini e delle condizioni QIAGEN, che sono altresì presenti sul retro delle nostre fatture. In caso di domande sulle specifiche o sulle prestazioni dei prodotti, contattare il reparto di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro della copertina o visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio supporto tecnico. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da scienziati esperti che hanno alle spalle una lunga esperienza maturata a livello pratico e teorico nelle tecnologie per campioni e test e nell'impiego dei prodotti QIAGEN. In caso volette porgere delle domande o incontriate delle difficoltà con il kit Investigator Hexaplex ESS o con i prodotti QIAGEN in generale, vi preghiamo di non esitare a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri ricercatori che a quelli della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a contattarci, in caso di suggerimenti da darci sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche.

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultate il nostro sito [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) oppure contattate il servizio assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di gestione della qualità con certificazione ISO della QIAGEN, ciascun lotto di kit Investigator Hexaplex ESS è testato con le specifiche predefinite per garantire una qualità costante del prodotto.

## **Informazioni di sicurezza**

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza sul prodotto (MSDS). Le schede MSDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx). Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda MSDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

## **Informazioni di emergenza 24 ore su 24**

È possibile ottenere informazioni mediche di emergenza in inglese, francese e tedesco, 24 ore su 24, presso:

Centro di informazioni antiveneni, Magonza, Germania.

Tel: +49-6131-19240

## Introduzione

Il kit Investigator Hexaplex ESS serve come applicazione multiplex PCR per i cinque nuovi marker europei "mini Short Tandem Repeat" (miniSTR) raccomandati dalla Rete Europea di Istituti di Scienza Forense (ENFSI) e dall'European DNA Profiling Group (EDNAP) come parte della nuova serie europea standard di loci, più TH01 e amelogenina. In un'unica reazione PCR, D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045, più TH01 (TC11) e l'Amelogenina specifica per genere sono amplificati contemporaneamente.

Questi marker a basso peso molecolare permettono di rilevare i campioni degradati. Pertanto la taglia massima dell'amplicone per il kit è limitato a 213 bp. Il kit Investigator Hexaplex ESS è raccomandato per l'analisi delle macchie forensi e il pre-screening, nonché per l'analisi di follow-up di campioni genotipizzati in precedenza. Il marker TH01 serve da marker coerente per tutti gli altri database kit disponibili ed evita la confusione tra i campioni. La serie di primer specifici per i loci dei cinque nuovi miniSTR europei differisce da quella utilizzata nel kit Investigator ESSplex e nel kit ESSplex SE. Quindi è possibile identificare i dropout allelici dovuti a possibili mutazioni nel sito di legame del primer ed evitare false esclusioni dal database.

I primer sono marcati a fluorescenza con uno dei seguenti coloranti:

- 6-FAM™: Amelogenina, D22S1045, D1S1656
- BTG: TH01, D12S391
- BTY: D2S441, D10S1248.

La quantità ottimale di DNA in condizioni standard è di 0.2-0.5 ng. Le validazioni interne hanno dimostrato risultati affidabili con <0,1 ng DNA.

Il kit Investigator Hexaplex ESS è stato validato utilizzando il termociclatore GeneAmp® 9700, l'analizzatore genetico ABI PRISM® 310 e l'analizzatore genetico ABI PRISM 3100/3130.

La Tabella 1 e la Tabella 2 mostrano i loci STR con relativa mappatura cromosomica, motivi ripetuti e alleli che concordano con le linee guida della International Society for Forensic Genetics (ISFG) per l'uso di marker microsatelliti (Bär et al., 1997). I range degli alleli includono tutti gli alleli noti del National Institute of Standards and Technology (NIST al 05/2010) e della letteratura corrente.

### Software di analisi della validità per i prodotti per identificazione umana

I kit Investigator Human Identification PCR richiedono la calibrazione con un ladder allelico. Pertanto il software usato deve essere compatibile con i prodotti per identificazione umana (HID) per applicazioni forensi. Da parte nostra raccomandiamo i software GeneMapper® ID, GeneMapper ID-X o Genotyper®. I

file template Investigator facilitano l'analisi dei dati e sono validi con i software sopra menzionati.

**Tabella 1. Informazioni specifiche per loco per il kit Investigator Hexaplex ESS**

<b>Loco</b>	<b>Numero di accesso a GenBank®</b>	<b>Motivo ripetuto dell'allele di riferimento</b>	<b>Allele di riferimento</b>	<b>Range alleli</b>
Amelogenina X	M55418			
Amelogenina Y	M55419			
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>	17	9-21
D2S441	AL079112	[TCTA] <sub>12</sub>	12	8-19
D10S1248	AL391869	[GGAA] <sub>13</sub>	13	8-21
D12S391	G08921	[AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT	19.3	13-28
D22S1045	AL022314	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>	17	7-20
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] <sub>9</sub>	9	3-14

**Tabella 2. Mappatura cromosomica del kit Investigator Hexaplex ESS**

<b>Loco</b>	<b>Mappatura cromosomica</b>
Amelogenina X	Xp22.1-22.3
Amelogenina Y	Yp11.2
D1S1656	1q42
D2S441	2p14
D10S1248	10q26.3
D12S391	12p13.2
D22S1045	22q12.3
TH01 (TC11)	11p15.5

## Materiali e dispositivi addizionali richiesti

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (MSDS), reperibili presso il fornitore.

- Hi-Di™ Formamide, 25 ml (Applied Biosystems®, cat. no. 4311320)
- Matrix Standards BT5 per strumenti monocapillari, per es. analizzatore genetico ABI PRISM 310 (vedere Informazioni per l'ordine, pag. 60)
- Matrix Standards BT5 per strumenti multicapillari, per es. ABI PRISM 3100/3130 (vedere Informazioni per l'ordine, pag. 60)
- Pipette e puntali per pipette
- Uno dei seguenti analizzatori per DNA:
  - analizzatore genetico ABI PRISM 310
  - analizzatore genetico ABI PRISM 3100-Avant/3100
  - analizzatore genetico ABI PRISM 3130/3130x1
- Uno sei seguenti termociclatori PCR:
  - ABI GeneAmp® 9700
  - Bio-Rad PTC-200
  - Techne TC-512
  - Biometra T1
  - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Provette o piastre PCR

# Protocollo: amplificazione mediante PCR

Questo protocollo è per l'amplificazione mediante PCR dei loci STR da campioni forensi mediante il kit Investigator Hexaplex ESS.

## Punti importanti prima di iniziare

- Preparare tutte le miscele di reazione in un'area separata da quella utilizzata per l'isolamento del DNA e per l'analisi dei prodotti PCR (post-PCR).
- Utilizzare puntali monouso con filtri idrofobici per ridurre al minimo una possibile cross-contaminazione.

## Prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i primer PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto in fondo alle provette.

## Procedura

### 1. Scongelare le soluzioni primer e l'acido nucleico stampo.

Miscelare accuratamente prima dell'uso.

### 2. Preparare una miscela di reazione come da Tabella 3.

La miscela di reazione contiene tutti i componenti necessari per la PCR, ad eccezione del DNA stampo (campione) e dell'acqua nuclease-free.

Preparare un volume di miscela di reazione superiore del 10% a quello necessario per il numero complessivo di test PCR da eseguire. La miscela deve includere reazioni di controllo positive e negative.

### 3. Miscelare a fondo la miscela di reazione e dispensarne un volume appropriato nelle provette PCR o nei pozzetti di una piastra PCR.

### 4. Aggiungere DNA stampo e acqua nuclease-free alla miscela di reazione, in modo da ottenere un campione con volume finale di 25 $\mu$ l.

### 5. Preparare i controlli positivi e negativi.

Controllo positivo: diluire la soluzione madre da 2,0 ng/ $\mu$ l di DNA di controllo XY13 a 0,25 ng/ $\mu$ l in un volume appropriato di acqua nuclease-free. Usare 1  $\mu$ l del DNA di controllo diluito.

Controllo negativo: usare acqua nuclease-free invece del DNA stampo nella reazione.

**Tabella 3. Setup della reazione**

<b>Componente</b>	<b>Volume per reazione</b>
Miscela di reazione A*	5,0 $\mu$ l
Miscela primer	2,5 $\mu$ l
Multi Taq2 DNA Polimerasi	0,4 $\mu$ l
Acqua nuclease-free (aggiunta nella fase 4)	Variabile
DNA stampo (aggiunto nella fase 4)	Variabile
<b>Volume totale della miscela di reazione</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

\* Contiene miscela di dNTP, MgCl<sub>2</sub> e albumina di siero bovino (BSA).

**6. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, impostando le condizioni indicate nella Tabella 4.**

Per le macchie contenenti piccole quantità di DNA (<100 pg/25  $\mu$ l di reazione), si raccomandano le condizioni di ciclo indicate nella Tabella 5.

**Nota:** Se si utilizza il termociclatore GeneAmp 9700, impostarlo su "Max Mode" o "Std Mode". Se si usa un termociclatore GeneAmp con modulo in blocco in alluminio, usare il modo "Std Mode", oppure con blocco in argento o argento placcato oro, il modo "Max Mode". Non usare il modo "9600 Emulation Mode".

**Tabella 4. Protocollo standard di ciclo, raccomandato per tutti i campioni di DNA**

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Numero di cicli</b>
94°C (avvio a caldo per attivare la DNA polimerasi)	4 min	–
96°C	30 s	5 cicli
61°C	120 s	
72°C	75 s	
94°C	30 s	25 cicli
61°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	–
10°C	∞	–

**Tabella 5. Protocollo opzionale di ciclo, consigliato per macchie contenenti piccole quantità di DNA (<100 pg)**

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Numero di cicli</b>
94°C (avvio a caldo per attivare la DNA polimerasi)	4 min	–
96°C	30 s	5 cicli
61°C	120 s	
72°C	75 s	
94°C	30 s	27 cicli
61°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	–
10°C	∞	–

## Protocollo: elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 310

Per istruzioni generali sul setup dello strumento, generazione della matrice e applicazione del software GeneScan® o GeneMapper ID, vedere il Manuale d'uso dell'analizzatore genetico ABI PRISM 310 (*ABI PRISM 310 Genetic Analyzer User's Manual*). Si descrive di seguito l'elettroforesi mediante il software GeneScan.

Il set di filtri virtuali G5 è usato per l'applicazione combinata dei cinque marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard di matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 6.

**Tabella 6. Materiali occorrenti per l'elettroforesi**

<b>Materiale</b>	<b>Specifiche</b>
Capillare	47 cm/50 µm (verde)
Polimero	POP-4™ per analizzatore genetico 310
Tampone	Tampone per analizzatore genetico 10x con EDTA

### Generazione della matrice

Prima di concludere l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA con il set di filtri G5, si deve generare una matrice con i cinque marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO (Tabella 7).

**Tabella 7. I cinque marker fluorescenti di BT5**

<b>Colore</b>	<b>Standard matrice</b>
Blu (B)	6-FAM
Verde (G)	BTG
Giallo (Y)	BTY
Rosso (R)	BTR
Arancio (O)	BTO

1. Si dovrebbero eseguire cinque cicli di elettroforesi, uno per ogni marker fluorescente, alle stesse condizioni utilizzate per i campioni e i ladder allelici del kit Investigator Hexaplex ESS, allo scopo di generare file matrice idonei (Tabella 8).

**Tabella 8. Setup della matrice per strumento monocapillare ABI (ABI 310)**

<b>Campione matrice</b>	<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
Campione matrice 1	Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
	Standard matrice 6-FAM	1,0 $\mu$ l
Campione matrice 2	Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
	Standard matrice BTG	1,0 $\mu$ l
Campione matrice 3	Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
	Standard matrice BTY	1,0 $\mu$ l
Campione matrice 4	Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
	Standard matrice BTR	1,0 $\mu$ l
Campione matrice 5	Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
	Standard matrice BTO	1,0 $\mu$ l

2. **Denaturare per 3 minuti a 95°C.**
3. **Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.**  
In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.
4. **Caricare i campioni sul vassoio.**
5. **Creare una Scheda Campione e immettervi la descrizione del campione. La Tabella 9 riporta la lista d'iniezione per la generazione della matrice.**

**Tabella 9. Lista d'iniezione per la generazione della matrice**

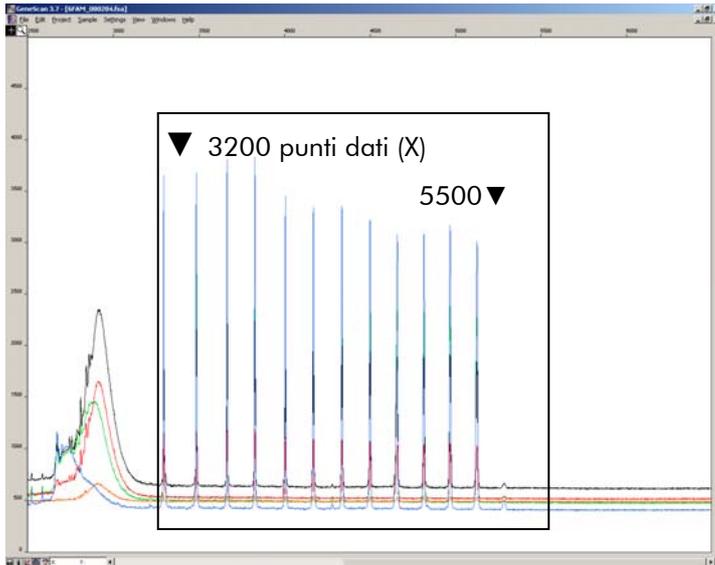
<b>Parametri</b>	<b>Impostazioni</b>
"Module File" (File modulo)	GS STR POP-4 (1 ml) G5
"Matrix File" (File matrice)	"None" (Nessuno)
"Size Standard" (Size standard) *	"None"
"Injection Time" (Durata iniezione) (s)	5
"Injection Voltage" (Tensione iniezione) (kV)	15
"Run Voltage" (Tensione ciclo) (kV)	15
"Run Temperature" (Temperatura ciclo) (°C)	60
"Run Time" (Durata ciclo) (min)	24

\* Preparare sempre gli standard matrice senza DNA size standard (BTO).

### **Analisi dei campioni matrice**

- 1. Lanciare il software GeneScan.**
- 2. Selezionare "New" (Nuovo) dal menu File, poi selezionare "Project" (Progetto).**
- 3. Aprire la cartella del ciclo corrente e selezionare "Add Sample Files" (Aggiungi file campione).**
- 4. Selezionare un campione matrice nella colonna "Sample File" (File campione).**
- 5. Cliccare su "Sample" (Campione) e poi su "Raw Data" (Dati grezzi).**
- 6. Controllare se i campioni matrice hanno una baseline piatta. Come mostrato dalla figura sotto, dovrebbero esserci almeno 5 picchi con altezze di 1000–4000 RFU per ogni campione matrice.**

**Nota:** il range ottimale è 2000–4000 RFU.

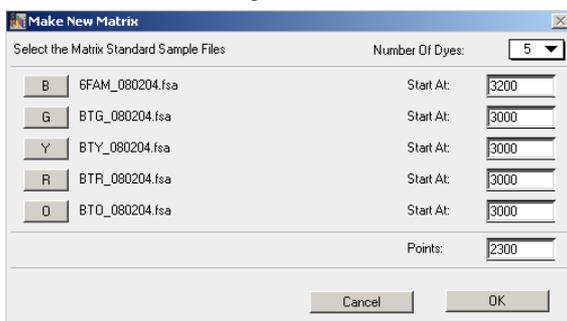


Eleetroferogramma con i dati grezzi dello standard matrice 6-FAM.

7. Selezionare un range di analisi con baseline piatta e reiniettare, se necessario, il campione matrice.
8. Registrare il valore iniziale e finale (punti dati) del range di analisi; per es. valore iniziale 3200, valore finale 5500.
9. Calcolare la differenza tra valore iniziale e finale; per es.  $5500 - 3200 = 2300$  punti dati.

#### Generazione di una matrice

1. Selezionare "New" dal menu File, poi selezionare "Matrix" (Matrice).
2. Importare i campioni matrice per tutti i coloranti (B, G, Y, R e O).
3. Immettere un valore "Start At" (a partire da), per es. 3200.
4. Sotto "Points" (Punti), immettere la differenza calcolata tra valore iniziale e finale, per es. 2300.
5. Cliccare "OK" per calcolare la nuova matrice.



Selezione del campione matrice.

6. Selezionare "Save As" (Salva con nome) nel menu "File" per salvare la nuova matrice nella cartella matrici.

	Reactions				
	B	G	Y	R	O
B	1.0000	0.1811	0.0051	0.0418	0.0006
G	0.6891	1.0000	0.2056	0.3259	0.0017
Y	0.4687	0.8068	1.0000	0.9119	0.0029
H	0.1944	0.3819	0.5311	1.0000	0.0095
O	0.0160	0.0304	0.0477	0.2082	1.0000

**Nuova matrice BT5.**

### Controllo della matrice

1. Per controllare la nuova matrice con i campioni correnti, selezionare "New" dal menu "File", poi selezionare "Project" (Progetto).
2. Aprire la cartella del ciclo rispettivo e selezionare "Add Sample Files".
3. Selezionare uno o più campioni nella colonna File campioni.
4. Cliccare "Sample" (Campione) e poi "Install New Matrix" "Installa nuova matrice" per aprire la cartella matrici e selezionare una nuova matrice.
5. Rianalizzare i campioni.

**Nota:** Con la nuova matrice non dovrebbero essere presenti picchi pull-up tra i pannelli coloranti (B, G, Y, R, O).

## Preparazione del campione

1. Preparare una miscela di formamide e DNA size standard secondo la Tabella 10.

**Tabella 10. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard**

Componente	Volume per campione
Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. Ripartire 12  $\mu$ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.
3. Aggiungere 1  $\mu$ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluire, se necessario).
4. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
5. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

6. Caricare i campioni sul vassoio.

### Intensità dei segnali

Per aumentare l'intensità del segnale del campione:

- Ridurre il volume del DNA Size Standard 550 (BTO) ad altezze di picco di circa 500 RFU.
- Purificare i prodotti PCR prima di iniziare l'analisi. Si consiglia il kit MinElute® PCR Purification per una purificazione rapida ed efficace (vedere Informazioni per l'ordine).

## Configurazione del software GeneScan

Creare una Scheda Campione e immettervi la descrizione del campione.

**Tabella 11. Lista d'iniezione**

<b>Componente</b>	<b>Impostazioni</b>
"Module File" (File modulo)	GS STR POP-4 (1 ml) G5
"Matrix File" (File matrice)	per es. Matrix BT5
"Size Standard" (Size Standard)	per es. SST-BTO_60-260bp
"Injection Time" (Durata iniezione) (s) *	5
"Injection Voltage" (Tensione iniezione) (kV)	15
"Run Voltage" (Tensione ciclo) (kV)	15
"Run Temperature" (Temperatura ciclo) (°C)	60
"Run Time" (Durata ciclo) (min) <sup>†</sup>	20

\* Deviando dalle impostazioni standard, la durata d'iniezione può variare da 1 a 10 s a seconda del tipo di campione. Se sono registrati campioni con intensità altissima del segnale, si può selezionare una durata d'iniezione più breve. Per i campioni a basso tenore di DNA, può essere necessaria una durata dell'iniezione fino a 10 s.

<sup>†</sup> A seconda delle condizioni dell'analisi, la durata del ciclo per Investigator Hexaplex ESS è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 240 bp.

## Parametri dell'analisi

La Tabella 12 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

**Tabella 12. Parametri d'analisi raccomandati per l'ABI PRISM 310.**

Parametri	Impostazioni
"Analysis Range" (Range analisi)	"Start": 2000 "Stop": 10 000
"Data Processing" (Elaborazione dati)	"Baseline": "Checked" (controllata) "Multi-component" (Multi-componente): "Checked" "Smooth options" (Opzioni smoothing): "Light" (leggero)
"Peak Detection" (Rilevamento picchi)	"Peak Amplitude Thresholds" (Soglie di ampiezza picchi) B:* Y:* G:* R:* O:* "Min. Peak Half Width" (Min. semilarghezza picco): 2 pts "Polynomial Degree" (Grado polinomiale): 3 "Peak Window Size" (Misure finestra picco): 11 pts <sup>†</sup>
"Size Call Range" (Range assegnazione taglia)	Min: 60 Max: 550
"Size Calling Method" (Metodo di assegnazione taglia)	Local Southern Method
"Split Peak Correction" (Correzione separazione picco)	"None" (Nessuno)

\* La soglia di ampiezza del picco (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che può essere rilevata dal software GeneScan or GeneMapper ID. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio.

Raccomandazione: l'altezza minimo del picco dovrebbe essere pari a tre volte il rumore di fondo della baseline.

† Solo l'impostazione delle misure della finestra picco è diversa dai valori di default di Applied Biosystems per l'analisi HID.

**Nota:** per informazioni sull'uso dei file template (come parametri di analisi), consultare la relativa Guida utente per i file template di Investigator (Genotyper, GeneMapper ID o GeneMapper ID-X).

## Protocollo: elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 3100-Avant/3100

Per istruzioni dettagliate sul setup dello strumento, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software ABI PRISM 3100 Data Collection versione 1.01 o 1.1 e del software GeneScan, consultare il manuale per l'utente dell'analizzatore genetico ABI PRISM 3100-Avant/3100 (*ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual*).

Il sistema con 4 capillari è l'ABI 3100-Avant, quello con 16 capillari è l'ABI 3100.

Il set di filtri virtuali G5 è usato per l'applicazione combinata dei cinque marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard di matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 13.

**Tabella 13. Materiali occorrenti per l'elettroforesi**

<b>Materiale</b>	<b>Specifiche</b>
Capillare	Serie di capillari da 36 cm per 3100-Avant/3100
Polimero	Polimero POP-4 per 3100
Tampone	Tampone per analizzatore genetico 10x con EDTA

### Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Una corretta calibrazione spettrale è fondamentale per la valutazione di sistemi multicolori con l'analizzatore genetico ABI PRISM 3100-Avant/3100 e deve essere eseguita prima dell'analisi della lunghezza dei frammenti. La procedura di calibrazione crea una matrice che è usata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

La calibrazione spettrale comprende le seguenti fasi:

- Preparazione degli standard di calibrazione spettrale
- Caricamento degli standard nella piastra di reazione a 96 pozzetti (un campione per capillare)
- Immissione della composizione della piastra
- Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale e controllo della matrice

## Preparazione degli standard di calibrazione spettrale

### Esempio per 4 capillari (ABI 3100-Avant)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 secondo la Tabella 14.

**Tabella 14. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 4 capillari**

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
Hi-Di Formamide	60 $\mu$ l
Standard matrice BT5	5 $\mu$ l

2. Caricare 12  $\mu$ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizione A1–D1.
3. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
4. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

### Esempio per 16 capillari (ABI 3100)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 secondo la Tabella 15.

**Tabella 15. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 16 capillari**

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
Hi-Di Formamide	204 $\mu$ l
Standard matrice BT5	17 $\mu$ l

2. Caricare 12  $\mu$ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizioni A1–H1 e A2–H2.
3. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
4. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclature regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

### **Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale**

Il file parametri per DyeSet G5 deve essere modificato una volta per ottenere una corretta calibrazione con il software Data Collection versione 1.0.1 o 1.1.

#### **Parametro spettrale**

- 1. Per cambiare le impostazioni nel file parametri, seguire questo percorso:**

**D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection  
SupportFiles\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles**

- 2. Selezionare "MtxSTD{Genescan\_SetG5} per aprire il file PAR.**
- 3. Cambiare "Condition Bounds Range" in [1.0; 20.0].**
- 4. Se la calibrazione non è riuscita, portare anche la Sensibilità a 0.1 e la Qualità a 0.8.**
- 5. Selezionare "Save As" nel menu File e salvare il file parametri con il nuovo nome; per es. MtxStd{Genescan\_SetG5\_BT5}.par.**

**Nota:** usare sempre questo file parametri per i cicli di calibrazione spettrale con lo standard matrice BT5 QIAGEN.

#### **Editor piastra per calibrazione spettrale**

- 1. Collocare la piastra a 96 pozzetti sul vassoio dell'autocampionatore.**
- 2. Lanciare il software ABI PRISM 3100 Data Collection.**
- 3. In Plate View (Visualizza piastra) cliccare "New" per aprire la finestra di dialogo dell'editor piastra.**
- 4. Immettere un nome per la piastra.**
- 5. Selezionare una calibrazione spettrale.**
- 6. Selezionare "96-Well" (96 pozzetti) come tipo di piastra e cliccare "Finish" (Fine).**

**Tabella 16. Editor piastra per calibrazione spettrale**

<b>Parametri</b>	<b>Impostazioni</b>
"Sample Name" (Nome campione)	Immettere un nome per i campioni matrice
"Dye Set" (Set coloranti)	G5
"Spectral Run Module" (Modulo ciclo spettrale)	Predefinito (per es. Spect36_POP4)
"Spectral Parameters" (Parametri spettrali)	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (parametri creati in precedenza)

- 7. Cliccare l'intestazione della colonna per selezionare tutta la colonna, quindi selezionare "Fill Down" (Riempire) nel menu Edit per applicare le informazioni ai campioni selezionati. Confermare cliccando "OK".**
- 8. Collegare la piastra di reazione sul vassoio dell'autocampionatore con l'ID piastra creata e avviare il ciclo.**
- 9. Al termine del ciclo, controllare nella casella di dialogo Risultato Calibrazione Spettrale che tutti i capillari abbiano superato la calibrazione con esito positivo (etichetta A).**

Se alcuni capillari sono stati etichettati con X, vedere il Manuale d'uso dell'analizzatore genetico ABI PRISM (*ABI PRISM Genetic Analyzer User's Manual*).
- 10. Cliccare "OK" per confermare il completamento del ciclo.**

### **Controllo della matrice**

- 1. Selezionare "Display Spectral Calibration" (Visualizza calibrazione spettrale) dal menu Tools menu, poi "Dye Set" (Serie coloranti) e "G5" per revisionare il profilo di calibrazione spettrale per ogni capillare.**
- 2. Il valore qualità (valore Q) deve essere superiore a 0,95 e il numero di condizione (valore C) deve essere tra 1 e 20. Entrambi i valori devono essere entro il range predeterminato.**
- 3. Controllare che i campioni matrice abbiano una baseline piatta. In ogni campione matrice dovrebbero essere presenti cinque picchi di altezza 1000–5000 RFU.**

**Nota:** il range ottimale è 2000–4000 RFU.

4. **Controllare la nuova matrice con i campioni correnti. Con la nuova matrice non dovrebbero essere presenti picchi pull-up tra i pannelli coloranti (B, G, Y, R e O).**
5. **Se la calibrazione non è riuscita, vedere la sezione "Parametro spettrale" a pag. 24.**
6. **Se tutti i capillari hanno superato la calibrazione, l'ultimo file di calibrazione per il set di coloranti G5 deve essere attivato manualmente. Cliccare "Set Active Spectral Calibration" (Impostare calibrazione spettrale attiva) nel menu Tools.**
7. **Rinominare il file di calibrazione sotto Set Matrix Name (Imposta nome matrice) (per es. BT5\_Date of calibration).**

## Preparazione del campione

1. **Preparare una miscela di formamide e DNA size standard secondo la Tabella 17.**

**Tabella 17. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard**

<b>Componente</b>	<b>Volume per campione</b>
Hi-Di Formamide	12 $\mu$ l
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. **Ripartire 12  $\mu$ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.**
3. **Aggiungere 1  $\mu$ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluire, se necessario).**
4. **Denaturare per 3 minuti a 95°C.**
5. **Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.**

In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

6. **Caricare i campioni sul vassoio.**

Poiché le iniezioni sono eseguite contemporaneamente per tutti i capillari, pipettare 4 o 16 campioni sulla piastra degli analizzatori multicapillari. Se si analizza un numero inferiore di campioni, le posizioni vuote devono essere riempite con 12  $\mu$ l di Hi-Di Formamide.

Per garantire l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, eseguire vari cicli di ladder.

La temperatura ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multicapillari, per cui si verificano picchi con spalla o separati, specie a basse temperature. Verificare che le condizioni ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento.

### **Intensità dei segnali**

Per aumentare l'intensità del segnale del campione:

- Ridurre il volume del DNA Size Standard 550 (BTO) ad altezze di picco di circa 500 RFU.
- Purificare i prodotti PCR prima di iniziare l'analisi. Si consiglia il kit MinElute PCR Purification per una purificazione rapida ed efficace (vedere Informazioni per l'ordine).

### **Configurazione del software GeneScan**

1. **Modificare il modulo del ciclo di default nel set coloranti G5 una volta per il primo ciclo. Selezionare "Module Editor" (Editor modulo) per aprire la finestra di dialogo.**
2. **Selezionare il modulo appropriato come stampo dalla tabella GeneScan (vedere Tabella 18).**
3. **Modificare la tensione di iniezione a 3 kV e la durata d'iniezione a 10 s.**
4. **Cliccare "Save As" e immettere il nome del nuovo modulo (per es. 3kV\_10s\_260bp). Confermare cliccando "OK".**
5. **Cliccare "Close" (Chiudi) per uscire dall'Editor del modulo.**

**Tabella 18. Parametri per il Modulo 3kV\_10s\_260bp**

<b>Parametri</b>	<b>Impostazione</b>
"Run Temperature" (Temperatura ciclo) (°C)	Valore predefinito
"Cap Fill Volume" (Volume riempimento cap.)	Valore predefinito
"Maximum Current" (Corrente massima) (A)	Valore predefinito
"Current Tolerance" (Tolleranza corrente) (A)	Valore predefinito
"Run Current" (Corrente ciclo) (A)	Valore predefinito
"Voltage Tolerance" (Tolleranza tensione) (kV)	3,0
"Pre-Run Voltage" (Tensione pre-ciclo) (kV)	10
"Pre-Run Time" (Durata pre-ciclo) (s)	Valore predefinito
"Injection Voltage" (Tensione iniezione) (kV)	Valore predefinito
"Injection Time" (Durata iniezione) (s) *	Valore predefinito
"Run Voltage" (Tensione ciclo) (kV)	Valore predefinito
"Number of Steps" (Numero di fasi)	Valore predefinito
"Voltage Step Interval" (Intervallo fase tensione)	Valore predefinito
"Data Delay Time" (Durata ritardo dati) (s)	Valore predefinito
"Run Time" (Durata ciclo) (min) <sup>†</sup>	15

\* Deviando dalle impostazioni standard, la durata d'iniezione può variare da 1 a 20 s a seconda del tipo di campione. Se sono registrati campioni con intensità altissima del segnale, si può selezionare una durata d'iniezione più breve. Per i campioni a basso tenore di DNA, può essere necessaria una durata dell'iniezione fino a 20 s.

<sup>†</sup> A seconda delle condizioni dell'analisi, la durata del ciclo per Investigator Hexaplex ESS è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 240 bp.

## Avvio del processo

1. Collocare la piastra a 96 pozzetti così preparata sul vassoio dell'autocampionatore.
2. Lanciare il software ABI PRISM 3100 Data Collection.
3. In Plate View (Visualizza piastra) cliccare "New" per aprire la finestra di dialogo dell'editor piastra.
4. Immettere un nome per la piastra.
5. Selezionare "GeneScan" come tipo di applicazione.
6. Selezionare "96-Well" (96 pozzetti) come tipo di piastra e cliccare "Finish" (Fine).

**Tabella 19. Impostazioni nell'editor piastra**

Parametri	Impostazioni
"Sample Name" (Nome campione)	Immettere un nome per i campioni matrice
"Dyes" (Coloranti)	O
"Color Info" (Info colore)	"Ladder" o "Sample" (Campione)
"Project Name" (Nome progetto)	per es. 3100_Project1
"Dye Set" (Set coloranti)	G5
"Run Module" (Modulo ciclo)*	3kV_10s_260bp
"Analysis Module 1" (Analisi modulo 1)	DefaultAnalysis.gsp

\* Vedere Tabella 18, "Parametri per modulo 3kV\_10s\_260bp".

7. Completare la tabella nell'editor piastra e cliccare "OK".
8. Cliccare l'intestazione della colonna per evidenziare tutta la colonna, quindi selezionare "Fill Down" (Riempire) nel menu Edit per applicare le informazioni ai campioni selezionati.
9. Collegare la piastra di reazione sul vassoio dell'autocampionatore con l'ID piastra creata e avviare il ciclo.
10. Completato il ciclo, visualizzare i dati come Dati Colore nella Visualizzazione Serie del software 3100 Data Collection o come File Campioni Analizzati in  
D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns.

## Parametri dell'analisi

La Tabella 20 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

**Tabella 20. Parametri d'analisi raccomandati per l'ABI PRISM 3100-Avant/3100.**

Parametri	Impostazioni
"Analysis Range" (Range analisi)	"Start": 2000 "Stop": 10 000
"Data Processing" (Elaborazione dati)	"Baseline": "Checked" (controllata) "Multi-component" (Multi-componente): "Checked" "Smooth options" (Opzioni smoothing): "Light" (leggero)
"Peak Detection" (Rilevamento picchi)	"Peak Amplitude Thresholds" (Soglie di ampiezza picchi) B:* Y:* G:* R:* O:* "Min. Peak Half Width" (Min. semilarghezza picco): 2 pts "Polynomial Degree" (Grado polinomiale): 3 "Peak Window Size" (Misure finestra picco): 11 pts <sup>†</sup>
"Size Call Range" (Range assegnazione taglia)	Min: 60 Max: 550
"Size Calling Method" (Metodo di assegnazione taglia)	Local Southern Method
"Split Peak Correction" (Correzione separazione picco)	"None" (Nessuno)

\* La soglia di ampiezza del picco (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che può essere rilevata dal software GeneScan or GeneMapper ID. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio.

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

† Solo l'impostazione delle misure della finestra picco è diversa dai valori di default di Applied Biosystems per l'analisi HID.

**Nota:** per informazioni sull'uso dei file template (come parametri di analisi), consultare la relativa Guida utente per i file template di Investigator (Genotyper, GeneMapper ID o GeneMapper ID-X).

## Protocollo: elettroforesi mediante l'analizzatore genetico ABI PRISM 3130/3130xl

Per istruzioni dettagliate sul setup dello strumento, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software ABI PRISM 3100 Data Collection versione 3.0 e del software GeneMapper ID, consultare la guida di avviamento per l'analizzatore genetico ABI PRISM 3130/3130xl (*ABI PRISM 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide*).

Il sistema con 4 capillari è l'ABI 3130, quello con 16 capillari è l'ABI 3130xl.

Il set di filtri virtuali Any5Dye è usato per l'applicazione combinata dei cinque marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard di matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 21.

**Tabella 21. Materiali occorrenti per l'elettroforesi**

<b>Materiale</b>	<b>Specifiche</b>
Capillare	Serie di capillari da 36 cm per 3130/3130xl
Polimero	Polimero POP-4 per 3130
Tampone	Tampone per analizzatore genetico 10x con EDTA

### Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Prima di concludere l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA si deve eseguire una calibrazione spettrale con i cinque marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO per ciascun analizzatore. La procedura di calibrazione crea una matrice che è usata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

La calibrazione spettrale comprende le seguenti fasi:

- Preparazione degli standard di calibrazione spettrale
- Caricamento degli standard nella piastra di reazione a 96 pozzetti (un campione per capillare)
- Creazione del protocollo dello strumento per la calibrazione spettrale (Protocol Manager)
- Definizione della composizione della piastra nell'editor della piastra (Plate Manager)
- Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale e controllo della matrice

## Preparazione degli standard di calibrazione spettrale

### Esempio per 4 capillari (ABI 3130)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 secondo la Tabella 22.

**Tabella 22. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 4 capillari**

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	60 $\mu$ l
Standard matrice BT5	5 $\mu$ l

2. Caricare 12  $\mu$ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizioni A1–D1.
3. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
4. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

### Esempio per 16 capillari (ABI 3130xl)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 secondo la Tabella 23.

**Tabella 23. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 16 capillari**

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	204 $\mu$ l
Standard matrice BT5	17 $\mu$ l

2. Caricare 12  $\mu$ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizioni A1–H1 e A2–H2.
3. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
4. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclature regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

### Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale

1. Collocare la piastra a 96 pozzetti sul vassoio dell'autocampionatore.
2. Nel Protocol Manager del software Data Collection, aprire la finestra Instrument Protocol (Protocollo Strumento).
3. Cliccare "New" per aprire la finestra di dialogo dell'editor del protocollo.
4. Completare la finestra di dialogo con le informazioni della Tabella 24 e cliccare "OK".

Tabella 24. Protocollo dello strumento per la calibrazione spettrale

Editor protocollo	Impostazioni
"Name" (Nome)	Utente (per es. Spectral36_POP4_BT5)
"Type" (Tipo)	"SPECTRAL" (SPETTRALE)
"Dye Set" (Set coloranti)	Any5Dye
"Polymer" (Polimero)*	Utente (per es. POP4)
"Array Length" (Lunghezza serie)*	Utente (per es. 36cm)
"Chemistry" (Chimica)	"Matrix Standard" (Standard matrice)
"Run Module" (Modulo ciclo)*	Predefinito (per es. Spect36_POP4_1)

\* Secondo il tipo di polimero e la lunghezza dei capillari usati.

5. Cliccare "New" nel Plate Manager del software Data Collection Software per aprire la finestra di dialogo New Plate (Nuova piastra).
6. Immettere le informazioni della Tabella 25 e cliccare "OK". Nell'Editor piastra si apre automaticamente una nuova tabella (Tabella 26).

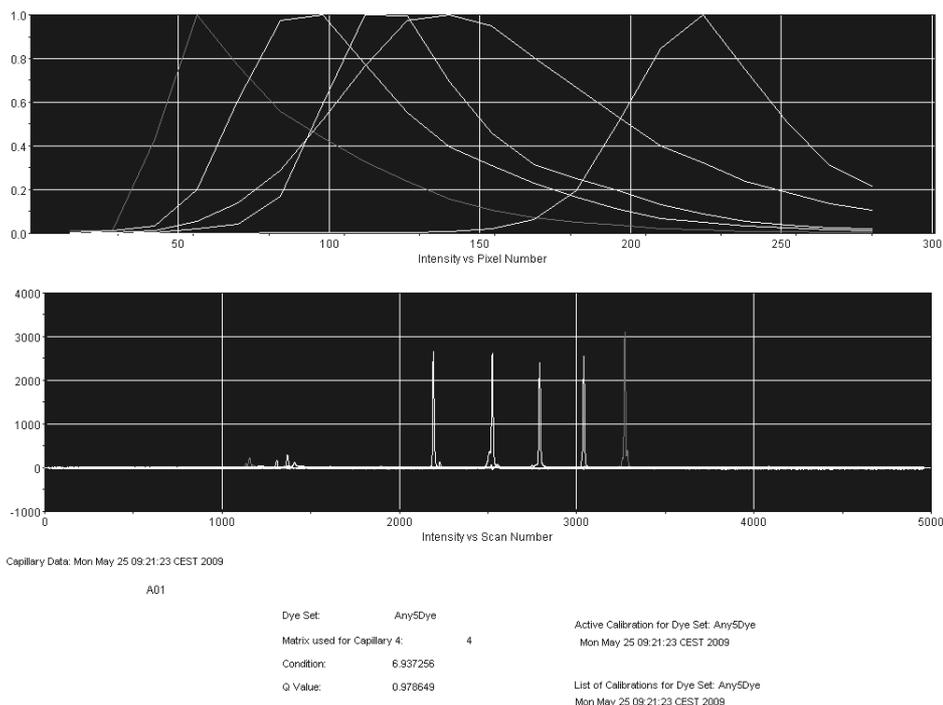
**Tabella 25. Editor piastra per calibrazione spettrale (I)**

<b>Nuovo dialogo piastra Impostazioni</b>	
"Name" (Nome)	per es. Spectral_BT5_date
"Application" (Applicazione)	"Spectral Calibration" (Calibrazione spettrale)
"Plate Type" (Tipo di piastra)	96 pozzetti
"Owner Name/ Operator Name" (Nome proprietario / nome operatore)	...

**Tabella 26. Editor piastra per calibrazione spettrale (II)**

<b>Parametri</b>	<b>Impostazioni</b>
"Sample Name" (Nome campione)	Immettere un nome per i campioni matrice
"Priority" (Priorità)	per es. 100
"Instrument Protocol 1" (Protocollo strumento 1)	Spectral36_POP4_BT5 (impostazione descritta in precedenza)

7. **Cliccare l'intestazione della colonna per selezionare tutta la colonna, quindi selezionare "Fill Down" (Riempire) nel menu Edit per applicare le informazioni ai campioni selezionati. Confermare cliccando "OK".**
8. **Collegare la piastra di reazione sul vassoio dell'autocampionatore con l'ID piastra creata (posizione A o B) e avviare il ciclo.**



## Elettroferogramma della calibrazione spettrale con lo standard matrice BT5 su ABI 3130.

### Controllo della matrice

1. Il valore qualità (valore Q) di ogni capillare deve essere superiore a 0,95 e il numero di condizione (valore C) deve essere tra 1 e 20.
2. Controllare che i campioni matrice abbiano una baseline piatta. Come mostrato dalla figura sopra, in ogni campione matrice dovrebbero essere presenti cinque picchi dell'altezza di circa 1000–5000 RFU.  
**Nota:** il range ottimale è 2000–4000 RFU.
3. Controllare la nuova matrice con i campioni correnti. Con la nuova matrice non dovrebbero essere presenti picchi pull-up tra i pannelli coloranti (B, G, Y, R, O).
4. Se la calibrazione non riesce, usare i valori ottimizzati dello standard matrice BT5 e ripetere la calibrazione.
5. Se tutti i capillari hanno superato la calibrazione, l'ultimo file di calibrazione per il set di coloranti Any5Dye viene attivato automaticamente nello Spectral Viewer. Rinominare il file di calibrazione (per es. BT5\_Date of calibration).

## Preparazione del campione

1. Preparare una miscela di formamide e DNA size standard secondo la Tabella 27.

**Tabella 27. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard**

Componente	Volume per campione
Hi-Di Formamide	12,0 $\mu$ l
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. Ripartire 12  $\mu$ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.
3. Aggiungere 1  $\mu$ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluire, se necessario).
4. Denaturare per 3 minuti a 95°C.
5. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, si può usare il termociclatore regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

6. Caricare i campioni sul vassoio.

Poiché le iniezioni sono eseguite contemporaneamente per tutti i capillari, pipettare 4 o 16 campioni sulla piastra degli analizzatori multicapillari. Se si analizza un numero inferiore di campioni, le posizioni vuote devono essere riempite con 12  $\mu$ l di Hi-Di Formamide.

Per garantire l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, eseguire vari cicli di ladder.

La temperatura ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multicapillari, per cui si verificano picchi con spalla o separati, specie a basse temperature. Verificare che le condizioni ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento.

### Intensità dei segnali

Per aumentare l'intensità del segnale del campione:

- Ridurre il volume del DNA Size Standard 550 (BTO) ad altezze di picco di circa 500 RFU.

- Purificare i prodotti PCR prima di iniziare l'analisi. Si consiglia il kit MinElute® PCR Purification per una purificazione rapida ed efficace (vedere Informazioni per l'ordine).

## **Configurazione del software GeneMapper ID**

- 1. Modificare il modulo del ciclo una volta per il primo ciclo. Cliccare "New" nel Module Manager del software Data Collection Software per aprire la finestra di dialogo Run Module Editor (Editor Modulo Ciclo).**
- 2. Modificare la tensione di iniezione a 3 kV e la durata d'iniezione a 10 s (Tabella 28).**
- 3. Cliccare "Save As", immettere un nome per il nuovo Modulo Ciclo (per es. 3kV\_10s\_260bp), e confermare cliccando "OK".**
- 4. Cliccare "Close" (Chiudi) per uscire dall'Editor del modulo.**

**Tabella 28. Parametri per il Modulo 3kV\_10s\_260bp**

<b>Parametri</b>	<b>Impostazioni</b>
"Oven Temperature" (Temperatura forno) (°C)	Valore predefinito
"Poly Fill Volume" (Volume riempimento polimero)	Valore predefinito
"Current Stability" (Stabilità corrente) ( $\mu A$ )	Valore predefinito
"Pre-Run Voltage" (Tensione pre- ciclo) (kV)	Valore predefinito
"Pre-Run Time" (Durata pre-ciclo) (s)	Valore predefinito
"Injection Voltage" (Tensione iniezione) (kV)	3,0
"Injection Time" (Durata iniezione) (s) *	10
"Voltage Number of Steps" (Tensione numero di fasi)	Valore predefinito
"Voltage Step Interval" (Intervallo fase tensione)	Valore predefinito
"Data Delay Time" (Durata ritardo dati) (s)	Valore predefinito
"Run Voltage" (Tensione ciclo) (kV)	Valore predefinito
"Run Time" (Durata ciclo) (s) <sup>†</sup>	900

\* Deviando dalle impostazioni standard, la durata d'iniezione può variare da 1 a 20 s a seconda del tipo di campione. Se sono registrati campioni con intensità altissima del segnale, si può selezionare una durata d'iniezione più breve. Per i campioni a basso tenore di DNA, può essere necessaria una durata dell'iniezione fino a 20 s.

† A seconda delle condizioni dell'analisi, la durata del ciclo per Investigator Hexaplex ESS è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 240 bp.

## **Avvio del processo**

- 1. Collocare la piastra a 96 pozzetti così preparata sul vassoio dell'autocampionatore.**
- 2. Aprire il Protocol Manager del software Data Collection.**

3. **Cliccare "New" nella finestra Instrument Protocol per aprire la finestra di dialogo dell'editor Protocol Editor e immettere i dati della Tabella 29.**
4. **Cliccare "OK" per uscire dal Protocol Editor.**

**Tabella 29. Impostazioni in Instrument Protocol**

<b>Editor protocollo</b>	<b>Impostazioni</b>
"Name" (Nome)	Run36_POP4_BT5_15min
"Type" (Tipo)	"REGULAR" (NORMALE)
"Run Module" (Modulo ciclo)*	3kV_10s_260bp
"Dye Set" (Set coloranti)	Any5Dye

\* Vedere Tabella 28, "Modulo ciclo 3kV\_10s\_260bp".

5. **Prima di ogni ciclo, occorre creare una definizione della piastra. Cliccare "New" nel Plate Manager del software Data Collection per aprire la finestra di dialogo New Plate (Nuova piastra).**
6. **Immettere i dati della Tabella 30.**

**Tabella 30. Plate Editor GeneMapper (I)**

<b>Editor protocollo</b>	<b>Impostazioni</b>
"Name" (Nome)	per es. Plate_BT5_Date
"Application" (Applicazione)	Selezionare "GeneMapper Application"
"Plate type" (Tipo di piastra)	96 pozzetti
"Owner Name/ Operator Name" (Nome proprietario / nome operatore)	...

7. **Cliccare "OK" per aprire automaticamente una nuova tabella nel Plate Editor (Tabella 31).**

- 8. Cliccare l'intestazione della colonna per selezionare tutta la colonna. Selezionare "Fill Down" (Riempire) nel menu Edit per applicare i dati a tutti i campioni selezionati. Fare clic su "OK".**
- 9. In Run Scheduler (Programmatore ciclo), cliccare su "Find All" (Trova tutto) e selezionare "Link" (Collega) per collegare la piastra di reazione sul vassoio dell'autocampionatore con il record piastra appena creato (posizione A o B).**

**Tabella 31. Plate Editor GeneMapper (II)**

<b>Parametri</b>	<b>Setup</b>
"Sample Name" (Nome campione)	Immettere un nome per i campioni
"Priority" (Priorità)	per es. 100 (valore predefinito)
"Sample Type" (Tipo di campione)	"Sample" (Campione) o "Allelic Ladder" (Ladder allelico)
"Size Standard" (Size Standard)	per es. SST-BTO_60-260bp
"Panel" (Pannello)	per es. Hexaplex ESS_Panels
"Analysis Method" (Metodo d'analisi)	per es. Analysis_HID_3130
"Snp Set"	–
"User-defined 1-3" (Definito da utente 1-3)	–
"Results Group 1" (Gruppo risultati 1)	(Selezionare gruppo risultati)
"Instrument Protocol 1" (Protocollo strumento 1)	Run36_POP4_BT5_15min (impostazione descritta in precedenza)

**10. Avviare il processo.**

**11. Durante il processo, visualizzare Error Status (Stato errori) in Event Log o esaminare la qualità dei dati grezzi per ogni capillare nel Capillaries Viewer (Visualizzatore Capillari) o in Cap/Array Viewer (Visualizzatore Cap/Serie).**

**12. Visualizzare i dati come panoramica in Run History (Cronologia cicli) o Cap/Array Viewer del software Data Collection.**

I dati del ciclo sono salvati nella cartella cicli del gruppo di risultati scelto in precedenza.

## Parametri dell'analisi / metodo dell'analisi

La Tabella 32 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

**Tabella 32. Impostazioni raccomandate nel foglio di lavoro Peak Detector (Rilevatore picchi)**

Parametri	Impostazioni
"Peak Detection Algorithm" (Algoritmo rilevamento picchi)	"Advanced" (Avanzato)
"Ranges" (Range)	"Analysis" (Analisi): "Partial Range" (Range parziale) "Start Point" (Punto d'inizio): 2000; "Stop Point" (Punto stop): 10 000 "Sizing" (Taglie): "All Sizes" (tutte le taglie)
"Smoothing and Baselining" (Smoothing e Baselining)	"Smoothing": "Light" (leggero) "Baseline Window" (Finestra baseline): 51 pts
"Size Calling Method" (Metodo di assegnazione taglia)	Local Southern Method
"Peak Detection" (Rilevamento picchi)	"Peak Amplitude Thresholds" (Soglie di ampiezza picchi) B:* Y:* G:* R:* O:* "Min. Peak Half Width" (Min. semilarghezza picco): 2 pts "Polynomial Degree" (Grado polinomiale): 3 "Peak Window Size" (Misure finestra picco): 11 pts <sup>†</sup> "Slope Thresholds" (Soglie pendenza): 0.0

\* La soglia di ampiezza del picco (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che può essere rilevata dal software GeneMapper ID. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio. Raccomandazione: l'altezza minimo del picco dovrebbe essere tre volte più elevata del rumore di fondo della baseline.

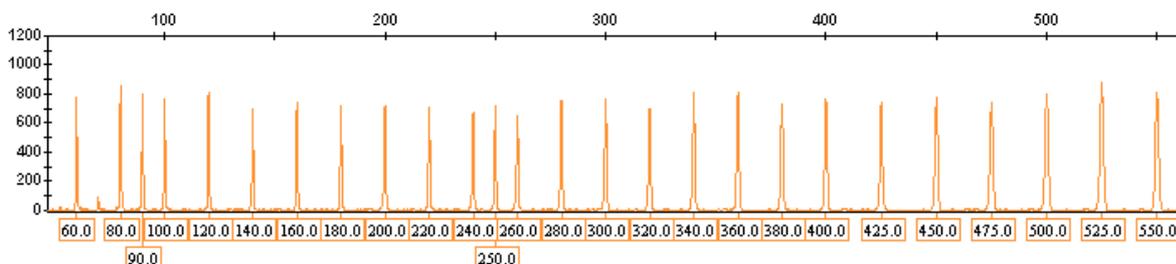
† Solo l'impostazione delle misure della finestra picco è diversa dai valori di default di Applied Biosystems per l'analisi HID.

**Nota:** per informazioni sull'uso dei file template (come parametri di analisi), consultare la relativa Guida utente per i file template di Investigator (Genotyper, GeneMapper ID o GeneMapper ID-X).

## Protocollo: analisi

Per istruzioni generali sull'analisi automatica di campioni, vedere la guida utente del software GeneScan o GeneMapper ID (*GeneScan or GeneMapper ID Software User Guide*).

L'individuazione della lunghezza esatta dei prodotti amplificati dipende dal tipo di apparecchio, dalle condizioni dell'elettroforesi e dal DNA size standard usato. A causa della complessità di alcuni loci, la determinazione della taglia dovrebbe essere basata su una distribuzione uniforme dei riferimenti. Utilizzare preferibilmente il DNA Size Standard 550 (BTO) con frammenti della seguente lunghezza: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 e 550 bp.



**Figura 1. Elettroferogramma del DNA Size Standard 550 (BTO), frammenti con lunghezza in bp.**

**Nota:** i file template base per il DNA Size Standard 550 (BTO) devono essere aggiustati a 260 bp nell'ambito del software GeneMapper ID. Il nuovo template può essere salvato per es. come SST-BTO\_60-260bp e usato per analisi successive.

## File template di Investigator

L'allocazione degli alleli deve essere effettuata con un software d'analisi idoneo, per es. GeneMapper ID, GeneMapper ID-X o Genotyper in combinazione con i file template Investigator disponibili per il download da [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o su CD-ROM (cat. no. 389900), vedere Tabella 33 e Tabella 34.

Il file template Investigator per il software Genotyper è Hexaplex ESS.

**Tabella 33. File template Investigator raccomandati per GeneMapper ID**

<b>Tipo file</b>	<b>Nome file</b>
"Panels" (Pannelli)	Hexaplex_ESS_Panels
"BinSets"	Hexaplex_ESS_Bins
"Size Standard"	SST-BTO_60-500bp (aggiustare fino a 260 bp)
"Analysis Method" (Metodo d'analisi)	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu
"Plot Settings" (Impostazioni plot)	PlotsBT5_4dyes
"Table Settings" (Impostazioni tabella)	Tabella per 2 alleli Tabella per 10 alleli

Pannelli e BinSets devono essere usati sempre, mentre gli altri file template sono opzionali.

**Tabella 34. File template Investigator raccomandati per GeneMapper ID-X**

<b>Tipo file</b>	<b>Nome file</b>
"Panels" (Pannelli)	Hexaplex_Panels_x
"BinSets"	Hexaplex_ESS_Bins_x
"Stutter"	Hexaplex_ESS_Stutter_x
"Size Standard"	SST-BTO_60–500bp (aggiustare fino a 260 bp)
"Analysis Method" (Metodo d'analisi)	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu
"Plot Settings" (Impostazioni plot)	PlotsBT5_4dyes
"Table Settings" (Impostazioni tabella)	Analisi dati 310/Analisi dati 31xx (ABI)

Pannelli e BinSets devono essere usati sempre, mentre gli altri file template sono opzionali.

## Controlli

Gli alleli elencati nella Tabella 35 rappresentano il Controllo DNA XY13 (incluso nel kit Investigator Hexaplex ESS) e il DNA di altre linee cellulari standard disponibili in commercio.

**Tabella 35. Assegnazione degli alleli del kit Investigator Hexaplex ESS**

<b>Loco</b>	<b>Controllo DNA XY13</b>	<b>ATCC K-562</b>	<b>CCR 9947A</b>	<b>CCR 9948</b>	<b>CCR 3657</b>
Amelogenina	X/Y	X/X	X/X	X/Y	X/Y
D1S1656	16/17.3	15/16	18.3/18.3	14/17	13/18.3
D2S441	10/11	10/14	10/14	11/12	14/14
D10S1248	14/15	12/12	13/15	12/15	14/16
D12S391	16/18	23/23	18/20	18/24	18/19
D22S1045	17/18	16/16	11/14	16/18	11/17
TH01	6/7	9.3/9.3	8/9.3	6/9.3	7/9.3

Per ulteriore conferma, la tabella precedente riporta gli alleli del DNA di riferimento acquistato da ATCC (<http://atcc.org/Products/PurifiedDNA.cfm#celllines>) e i tre DNA di riferimento acquistati da Coriell Cell Repositories (CCR; <http://locus.umdj.edu/nigms/>) nel rispetto degli standard di Szibor et al. (2003).

## Lunghezza di frammenti e alleli

Le Tabella 36–38 riportano la lunghezza dei frammenti dei singoli alleli con riferimento al DNA Size Standard 550 (BTO). Tutte le analisi sono state eseguite su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130 con un polimero POP-4 (Figura 2 e Figura 3). Con strumenti per analisi, DNA size standard o polimeri differenti, la lunghezza dei frammenti può risultare diversa. Si raccomanda inoltre un allineamento visivo con il ladder allelico.

### Scala

- Orizzontale: 70–245 bp
- Verticale: secondo l'intensità del segnale

**Tabella 36. Lunghezza dei frammenti del ladder allelico Hexaplex ESS analizzato su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130 (pannello blu)**

Marker/ allele	Taglia (bp)*	Altri alleli†	Marker/ allele	Taglia (bp)*	Altri alleli†
<b>Amelogenina</b>	<b>6-FAM</b>		<b>DIS1656</b>	<b>6-FAM</b>	
X	77	–	10	170	9
Y	80	–	11	174	–
<b>D22S1045</b>	<b>6-FAM</b>		12	178	–
10	122	7, 8, 9	13	182	–
11	125	–	14	186	14.3
12	128	–	15	191	15.3
13	131	–	16	195	16.3
14	134	–	17	199	17.1
15	137	–	17.3	202	–
16	140	–	18.3	206	18
17	143	–	19.3	210	19, 20.3
18	146	–			
19	149	20			

\* Arrotondato all'intero.

† Gli alleli "off-ladder" sono allocati con gli attuali file template Investigator per il software GeneMapper ID, GeneMapper ID-X o Genotyper. Per altri alleli, vedere fra gli altri [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str\\_fact.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm).

**Tabella 37. Lunghezza dei frammenti del ladder allelico Hexaplex ESS analizzato su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130 (pannello verde)**

<b>Marker/ allele</b>	<b>Taglia (bp)*</b>	<b>Altri alleli†</b>	<b>Marker/ allele</b>	<b>Taglia (bp)*</b>	<b>Altri alleli†</b>
<b>TH01</b>	<b>BTG</b>		<b>D12S391</b>	<b>BTG</b>	
4	95	3	15	154	14
5	99	–	16	158	16.3
6	103	6.3	17	162	17.3
7	107	7.3	18	166	18.3
8	111	8.3	19	170	19.1, 19.3
9	115	9.1	20	174	20.3
9.3	118	–	21	178	–
10	119	–	22	182	–
10.3	123	11	23	187	–
13	132	–	24	191	–
13.3	135	–	25	195	–
			26	199	27

\* Arrotondato all'intero.

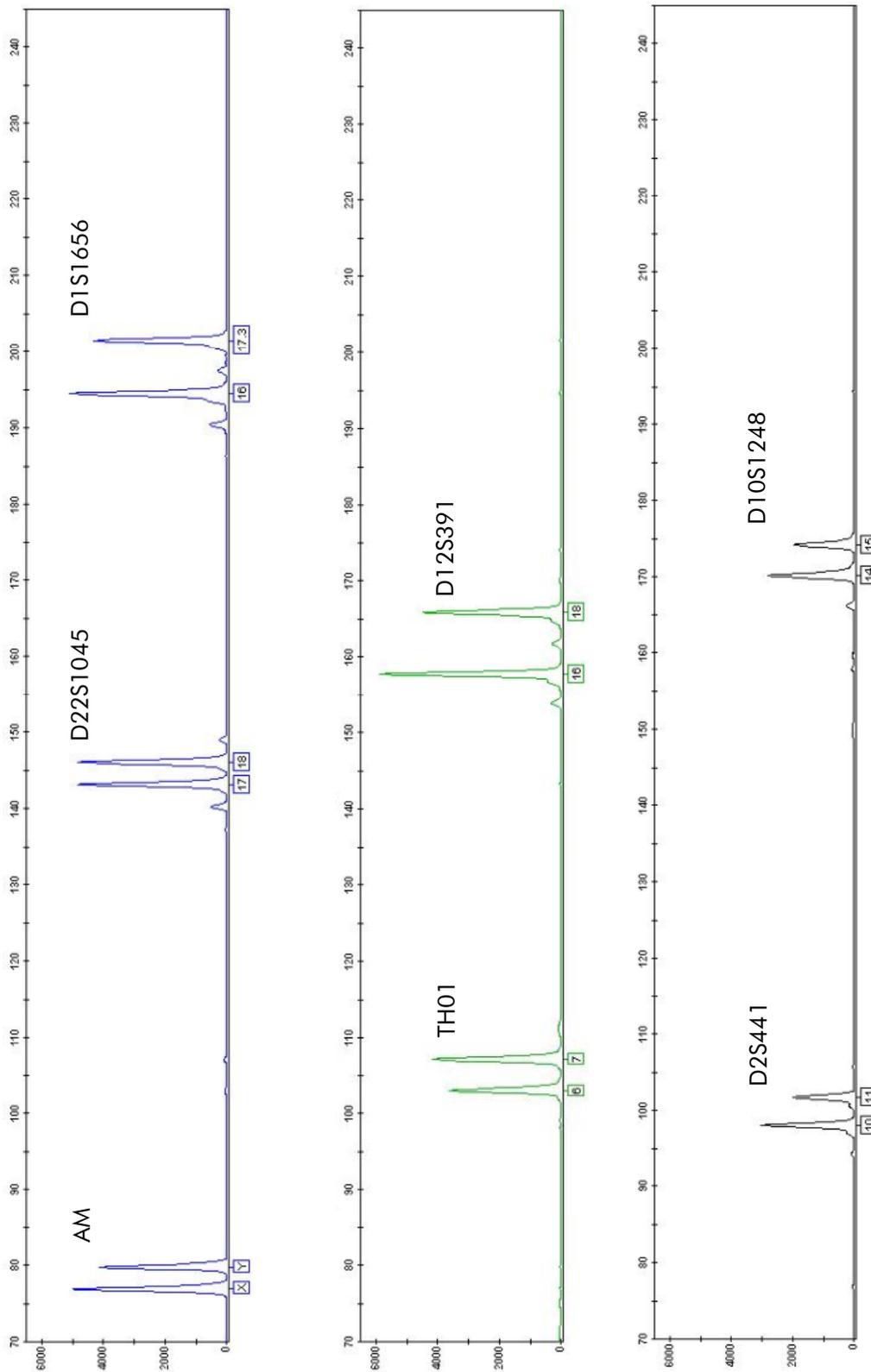
† Gli alleli "off-ladder" sono allocati con gli attuali file template Investigator per il software GeneMapper ID, GeneMapper ID-X o Genotyper. Per altri alleli, vedere fra gli altri [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str\\_fact.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm).

**Tabella 38. Lunghezza dei frammenti del ladder allelico Hexaplex ESS analizzato su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130 (pannello giallo)**

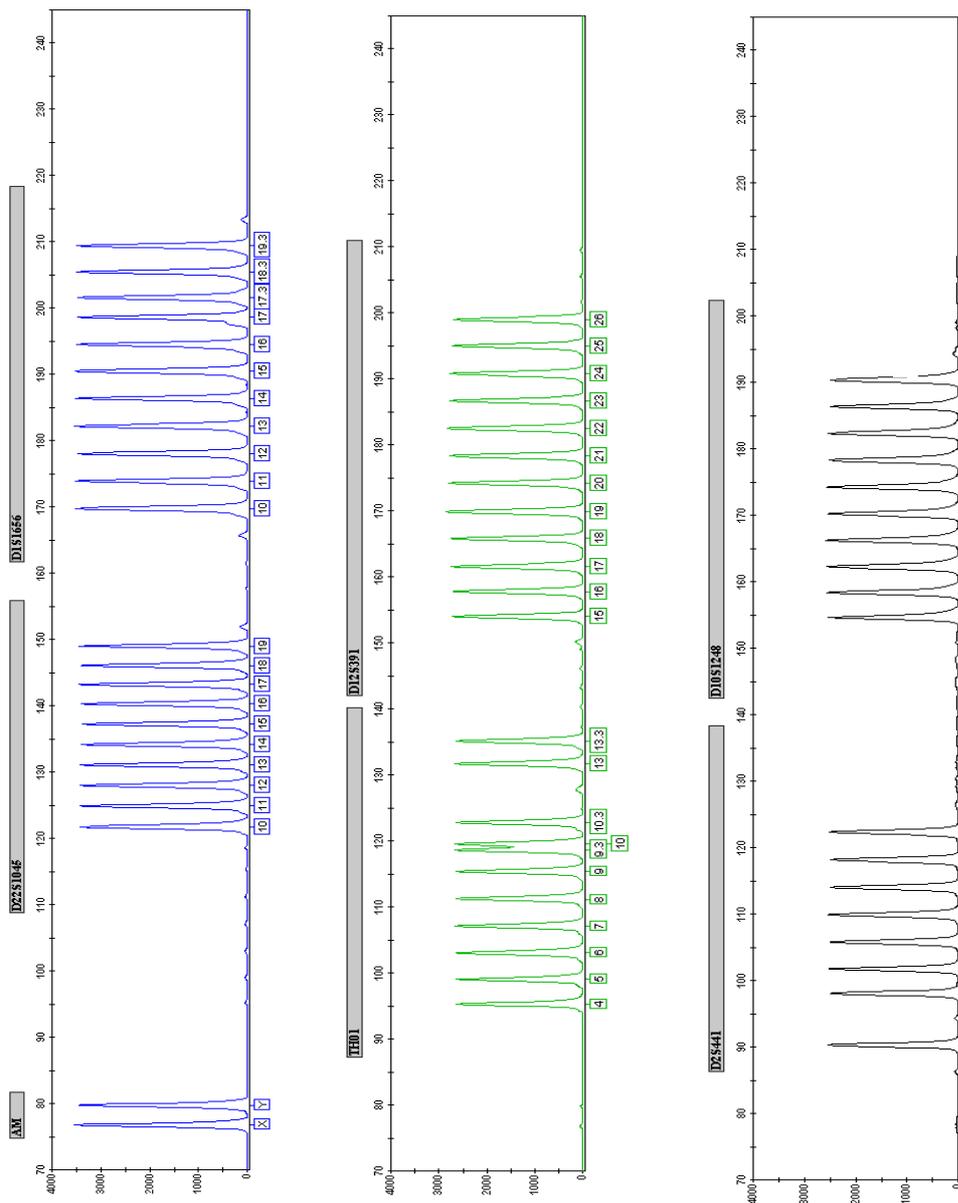
Marker/ allele	Taglia (bp)*	Altri alleli <sup>†</sup>	Marker/ allele	Taglia (bp)*	Altri alleli <sup>†</sup>
<b>D2S441</b>	<b>BTY</b>		<b>D10S1248</b>	<b>BTY</b>	
8	90	9	10	154	8, 9
10	98	–	11	158	–
11	101	11.3	12	162	–
12	105	12.3	13	166	–
13	109	13.1	14	170	–
14	114	–	15	174	–
15	118	–	16	178	–
16	122	17	17	182	–
			18	186	–
			19	190	–

\* Arrotondato all'intero.

<sup>†</sup> Gli alleli "off-ladder" sono allocati con gli attuali file template Investigator per il software GeneMapper ID, GeneMapper ID-X o Genotyper. Per altri alleli, vedere fra gli altri [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str\\_fact.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm).



**Figura 2. Elettroferogramma del kit Investigator Hexaplex ESS ottenuto con 250 pg Control DNA XY13.** L'analisi è stata effettuata su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130. L'assegnazione degli alleli è stata effettuata con il software GeneMapper ID e il file template Investigator Hexaplex ESS.



**Figura 3. Elettroferogramma del ladder allelico Hexaplex ESS analizzato su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130. L'assegnazione degli alleli è stata effettuata con il software GeneMapper ID e il file template Investigator Hexaplex ESS.**

## Interpretazione dei risultati

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

### Procedura generale per l'analisi

1. **Controllare il DNA size standard**
2. **Controllare il ladder allelico.**
3. **Verificare il controllo positivo.**
4. **Verificare il controllo negativo.**
5. **Analizzare e interpretare i dati del campione.**

### Picchi pull-up

Possono comparire picchi pull-up se l'altezza dei picchi è fuori del range di rilevamento lineare (>3000 RFU) o se è stata applicata una matrice non corretta. Tali picchi compaiono nella posizione di picchi specifici in altri canali cromatici, di norma con bassa intensità di segnale. L'altezza dei picchi non dovrebbe superare i 3000 RFU per evitare i picchi pull-up.

### Picchi di stutter

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

### Aggiunta di nucleotidi indipendente dal template

A causa dell'attività della sua terminal transferasi, la Taq polimerasi del DNA può causare adenilazione incompleta all'estremità 3' dei frammenti amplificati del DNA. Il picco dell'artefatto è più corto di una base rispetto a quanto previsto (-1 picchi). Tutti i primer inclusi nel kit Investigator Hexaplex ESS sono progettati per minimizzare questi artefatti. La formazione degli artefatti è ridotta ulteriormente dalla fase finale di estensione del protocollo PCR a 68°C per 60 minuti. L'altezza di picco dell'artefatto è in correlazione alla quantità di DNA. I laboratori dovrebbero definire i propri limiti per l'analisi dei picchi.

## **Artefatti**

La temperatura ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multicapillari, per cui si verificano picchi con spalla o separati. Se compaiono picchi con spalla o separati, si consiglia di iniettare nuovamente il campione.

## Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire eventuali dubbi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli scienziati addetti ai Servizi Tecnici della QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e test (per le informazioni sui contatti, vedere sul retro oppure visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Commenti e suggerimenti

---

#### Matrice/calibrazione spettrale non appropriate

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

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

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

a) Il DNA Size Standard 550 (BTO) non è stato correttamente definito o identificato

Cliccare sull'icona rossa "Size Match Editor" nella barra strumenti superiore del software GeneMapper ID-X. Contrassegnare i frammenti rossi o arancione di tutti i campioni.

Usare sempre il DNA Size Standard 550 incluso nei kit Investigator Human Identification PCR.

b) L'intensità dei segnali è troppo alta. Se l'altezza dei picchi dei campioni è al di fuori del range lineare di rilevamento (>4000 RFU/ABI310; >5000 RFU/ABI3130), possono aumentare le stutter, i picchi separati e gli artefatti

Ridurre la durata d'iniezione in incrementi minimi di 1 s, ridurre la quantità del prodotto di amplificazione PCR per l'analisi, o ridurre la quantità di DNA per PCR.

## Commenti e suggerimenti

---

- |  |  |
|--|--|
| c) La presenza di bolle nel capillare causa picchi pull-up in tutti i pannelli cromatici ("spike") che causano un misnumero allelico             | Ripetere l'elettroforesi per confermare i risultati.   |
| d) Le differenze di prestazioni tra i capillari di un analizzatore multicapillare possono causare uno spostamento nell'assegnazione degli alleli | Per l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, vanno eseguiti vari cicli di ladder allelici.   |
| e) Usare un programma PCR a 32 cicli per piccole quantità di DNA   | Quantità troppo piccole di DNA possono causare dropout allelici e squilibri dei picchi. Inoltre possono apparire prodotti di amplificazione aspecifici. Aumentando il numero di cicli, si ha un rischio di cross-contaminazione dovuta a impurità. |

### **Iniezione/file del ladder allelico non sono appropriati**

- |   |   |
|---|---|
| a) Si può identificare un segnale addizionale come picco del ladder allelico a causa di disfunzioni durante l'elettroforesi. Se i picchi del ladder allelico sono impropriamente nominati, il ladder non può essere usato per l'analisi | Usare differenti iniezioni/file del ladder allelico e controllare i dati delle taglie analizzate dal Size Standard (in bp) del ladder allelico.<br><br>Usare sempre il DNA Size Standard 550 per i kit Investigator Human Identification PCR. |
|---|---|

## Commenti e suggerimenti

---

- |  |  |
|--|--|
| b) Un solo picco del ladder allelico è sotto il valore di rilevamento dei picchi (50–200 RFU) del metodo di analisi usato, e quindi non è identificato | Il ladder allelico deve essere caricato sullo strumento analitico in concentrazione superiore a quella dei campioni da analizzare.<br><br>In alternativa, i dati del ladder allelico possono essere analizzati con un valore inferiore di rilevamento dei picchi nel software d'analisi. |
| c) Un solo picco del ladder allelico non è stato identificato perché fuori dal range di taglie (in bp) previsto dal software                           | Confrontare la lunghezza dei frammenti (in bp) del primo allele in un colore del ladder allelico con il colore corrispondente nelle categorie. Poi confrontarlo con gli altri alleli.  |
| d) Non sono stati trovati alleli punti   | Gli alleli punto sono cioè alleli con differenza di almeno 1 punto rispetto all'allele intero successivo. Controllare le impostazioni del metodo analitico. Ridurre a 11 punti il valore delle dimensioni della finestra picchi.   |

## Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave, che specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il sito QIAGEN Reference Database [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

### Riferimenti citati

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.

Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

## Informazioni per gli ordini

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>Cat. n°</b>
Investigator Hexaplex ESS Kit (100)	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380615
Investigator Hexaplex ESS Kit (400)	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380617
<b>Prodotti correlati</b>		
<b>Kit Investigator Human Identification PCR</b>		
Investigator ESSplex Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381515
Investigator ESSplex SE Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381525
Investigator Nonaplex ESS Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381315
Investigator Decaplex SE Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381025
Investigator IDplex Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381615
Investigator HDplex Kit (25)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381213
Investigator Triplex AFS QS Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380315
Investigator Triplex DSF Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380325

\* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori su richiesta.

<b>Prodotto</b>	<b>Contenuto</b>	<b>Cat. n°</b>
Investigator DIPplex Kit (25)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	384013
Investigator Template Files	Tutti i file template per i kit Investigator Human Identification PCR da usare con software GeneMapper ID, GeneMapper ID-X, e Genotyper Software e con il freeware DIPSorter (CD-ROM)	389900
Matrix Standard BT5 single cap. (5 x 25)	Standard matrice 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO	386113
Matrix Standard BT5 multi cap. (25)	Standard matrice 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO	386123
Matrix Standard BT5 multi cap. (50)	Standard matrice 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO	386125
<b>Estrazione e purificazione del DNA</b>		
QIAamp® DNA Investigator Kit (50)	50 colonne QIAamp MinElute, proteinasi K, carrier RNA, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	56504
EZ1® DNA Investigator Kit (48)	Cartucce reagenti (DNA Investigator), puntali con filtro monouso, porta-puntali monouso, provette per campioni (2 ml), provette di eluizione (1,5 ml), tampone G2, proteinasi K, carrier RNA	952034
MinElute PCR Purification Kit (50)*	50 colonne Spin MinElute, tamponi, provette di raccolta (2 ml)	28004

Per le informazioni di licenza aggiornate e i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

\* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori su richiesta.

**Note**

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, EZ1®, MinElute® (Gruppo QIAGEN); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Genotyper®, 6-FAM™, POP-4™, Hi-Di™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (US Department of Health and Human Services).

#### **Contratto di Licenza Limitato**

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del kit Hexaplex ESS dei seguenti termini:

1. Il kit Investigator Hexaplex ESS deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale Investigator Hexaplex ESS* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale Investigator Hexaplex ESS* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di licenza limitato, e recupererà tutte le spese di investigazione e legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di licenza limitato o qualunque diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2010 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Brazil** ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

**Italy** ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

**Korea (South)** ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**Mexico** ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

**Spain** ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

**USA** ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

