

Ottobre 2012

Manuale Investigator[®] ESSplex SE Plus

Per l'amplificazione multiplex del nuovo
European Standard Set of Loci, più SE33
e amelogenina



Sample & Assay Technologies

Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è un fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e test destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi 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, visitare il sito www.qiagen.com.

Indice

Contenuto del kit	4
Conservazione	4
Uso previsto	4
Informazioni di sicurezza	5
Introduzione	6
Materiali e dispositivi addizionali richiesti	8
Protocolli	
■ Amplificazione mediante PCR	9
■ Elettroforesi mediante lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	12
■ Elettroforesi mediante lo strumento ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer	19
■ Elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer	28
■ Elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer	38
■ Analisi	50
Interpretazione dei risultati	57
Guida alla risoluzione dei problemi	59
Riferimenti bibliografici	62
Informazioni per gli ordini	63

Contenuto del kit

Kit Investigator ESSplex SE Plus	(100)	(400)
N° catalogo	381545	381547
Numero di reazioni da 25 µl	100	400
Fast Reaction Mix* (Miscela di reazione rapida)	750 µl	2 x 1500 µl
Primer Mix ESSplex SE Plus (Miscela primer ESSplex SE Plus)	250 µl	4 x 250 µl
Control DNA 9948 (DNA di controllo 9948)	200 µl	200 µl
DNA size standard 550 (BTO) (DNA size standard 550 [BTO])	50 µl	200 µl
Allelic ladder ESSplex SE Plus (Ladder allelico ESSplex SE Plus)	25 µl	4 x 25 µl
Nuclease-free water (Acqua Nuclease-Free)	2 x 1,9 ml	5 x 1,9 ml
Quick-Start Protocol (Protocollo Quick-Start)	1	1

* Contiene HotStarTaq® Plus DNA Polimerasi, dNTP, MgCl₂, e sieroalbumina bovina (BSA).

Conservazione

Il kit Investigator ESSplex SE Plus viene spedito in ghiaccio secco. Al ricevimento deve essere immediatamente inserito in un freezer a temperatura costante a -20°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.

Una volta aperto, il kit Investigator ESSplex SE Plus deve essere conservato a 4-8°C per 2 settimane al massimo.

Uso previsto

Il kit Investigator ESSplex SE Plus è destinato ad applicazioni di biologia molecolare nelle analisi di medicina legale, identità umana e paternità. Il presente prodotto non è destinato alla diagnosi, alla prevenzione o al trattamento di malattie.

Prestare la massima attenzione durante la manipolazione dei prodotti. Consigliamo a tutti gli utenti dei prodotti QIAGEN di attenersi alle direttive NIH

sviluppate per gli esperimenti con DNA ricombinante o ad altre linee guida applicabili.

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 (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS 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 antiveleni, Magonza, Germania.

Tel: +49-6131-19240

Introduzione

Il kit Investigator ESSplex SE Plus è una PCR multiplex destinata alle indagini forensi. I 15 marker STR polimorfici raccomandati dalla European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) e dall'European DNA Profiling Group (EDNAP) come parte del nuovo European Standard Set of loci (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11] e vWA), più SE33 [ACTBP2] e l'amelogenina specifica per genere sono amplificati contemporaneamente.

Il kit Investigator ESSplex Plus è stato sviluppato specificamente per la generazione rapida e affidabile di profili di DNA a partire da campioni di sangue, tamponi orali e macchie di sangue forensi. Il kit si basa sulla tecnologia fast-cycling PCR QIAGEN, che consente di eseguire l'amplificazione in 90 minuti e garantisce risultati molto robusti grazie alla chimica inibitore resistente. I primer sono marcati a fluorescenza con uno dei seguenti coloranti:

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

La quantità ottimale di DNA in condizioni standard è di 0,5 ng. I test di validità interni hanno evidenziato risultati robusti ed equilibrati con una quantità di DNA di 0,2–2 ng e risultati affidabili con una quantità di DNA <0,1 ng.

Il kit Investigator ESSplex SE Plus è stato validato utilizzando il termociclatore GeneAmp® 9700 PCR (con blocco in argento placcato oro a 96 pozzetti) e l'Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer.

La Tabella 1 mostra i loci STR con relativa mappatura cromosomica e motivi ripetuti che concordano con le linee guida della International Society for Forensic Genetics (ISFG) per l'uso di marker microsatelliti (Bär et al., 1997). La nomenclatura per i loci STR D10S1248 e D22S1045 è conforme a Hill et al. (2008).

Tabella 1. Informazioni specifiche per locus per il kit Investigator ESSplex SE Plus

Loco	Numero di accesso a GenBank®	Motivo ripetuto dell'allele di riferimento	Mappatura cromosomica
Amelogenina X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amelogenina Y	M55419	–	Yp11.2
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 TTTTTCT [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

Materiali e dispositivi aggiuntivi 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. n° 4311320)
- Matrix Standard BT5 per strumenti monocapillari, per es. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (QIAGEN cat. n° 386113)
- Matrix Standard BT5 per strumenti multicapillari, per esempio ABI PRISM 3100, Applied Biosystems 3130 e 3500 (QIAGEN cat. n° 386123 o 386125)
- Pipette e puntali per pipette
Uno dei seguenti analizzatori di DNA:
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
ABI PRISM 3100-Avant™/3100 Genetic Analyzer
Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
- Uno sei seguenti termociclatori PCR:
QIAGEN Rotor-Gene® Q
GeneAmp PCR 9700
Bio-Rad PTC-200
Biometra UNO-Thermoblock
Eppendorf® Mastercycler® ep
- Provette o piastre PCR

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. Consigliamo i software Investigator IDproof, Investigator IDproof Mixture, GeneMapper® ID, GeneMapper ID-X, o Genotyper®. I file template Investigator facilitano l'analisi dei dati e sono validi con i software sopra menzionati.

Protocollo: amplificazione mediante PCR

Questo protocollo consente l'amplificazione mediante PCR dei loci STR da campioni forensi con il kit Investigator ESSplex SE Plus.

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 i rischi di cross-contaminazione.

Prima di iniziare

- Prima di aprire le provette con i componenti di PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto in fondo alle provette.
- La quantità ottimale di DNA in condizioni standard è di 0,5 ng. I test di validità interni hanno evidenziato risultati robusti ed equilibrati con una quantità di DNA di 0,2–2 ng e risultati affidabili con una quantità di DNA <0,1 ng.

Procedura

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

Miscelare accuratamente prima dell'uso.

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

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

Preparare un volume di miscela master 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 ripetutamente la miscela master 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 master, in modo da ottenere un campione con volume finale di 25 µl.

5. Preparare i controlli positivi e negativi.

Controllo positivo: usare 5 µl del DNA di controllo.

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

Tabella 2. Setup della reazione

Componente	Volume per reazione
Miscela di reazione rapida	7,5 μ l
Miscela primer	2,5 μ l
Acqua nuclease-free (aggiunta nella fase 4)	Variabile
DNA stampo (aggiunto nella fase 4)	Variabile
Volume totale	25 μl

6. Miscelare accuratamente le reazioni.

Per ottenere risultati ottimali, miscelare la piastra per PCR preparata e sigillata prima di effettuare l'amplificazione utilizzando un Eppendorf Thermomixer Comfort (agitatore orbitale) per 5 minuti a 1200 giri/min a temperatura ambiente. Eseguire una miscelazione costante e senza pause.

7. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, impostando le condizioni indicate nella Tabella 3.

Nota: se si usa il termociclatore 9700 GeneAmp PCR con blocco in alluminio, usare il modo "Std Mode", oppure con blocco in argento a 96 pozzetti o argento placcato oro a 96 pozzetti usare il modo "Max Mode". Non usare il modo "9600 Emulation Mode".

Tabella 3. Protocollo standard di ciclo, raccomandato per tutti i campioni di DNA

Temperatura	Time (Ora)	Numero di cicli
95°C*	5 min	–
96°C	10 s	30 cicli
61°C	120 s	
10°C	∞	–

* hot-start per attivare la DNA polimerasi.

- 8. Dopo aver completato il protocollo di ciclo, conservare i campioni a –20°C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'esecuzione dell'elettroforesi.**

Protocollo: elettroforesi mediante lo strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Per istruzioni generali sul setup dello strumento, la generazione della matrice e l'applicazione del software GeneScan® o GeneMapper ID, vedere il Manuale d'uso dello strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*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 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard matrice standard è conosciuto come BT5.

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

Tabella 4. Materiali occorrenti per l'elettroforesi

Materiale	Specifiche
Capillare	47 cm/50 µm (verde)
Polimero	POP-4™ per strumento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Tampone	Tampone 10x con EDTA per Genetic Analyzer

Generazione della matrice

Prima di effettuare l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA con il set di filtri G5, si deve generare una matrice con i 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO (Tabella 5).

Tabella 5. I 5 marker fluorescenti di BT5

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

1. Si dovrebbero eseguire cinque elettroforesi, uno per ogni marker fluorescente, alle stesse condizioni dei campioni e dei ladder allelici del kit Investigator ESSplex SE Plus, allo scopo di generare file matrice idonei (Tabella 6).

Tabella 6. Setup matrice per strumento monocapillare (ABI PRISM 310)

Campione matrice	Componente	Volume
Campione matrice 1	Hi-Di Formamide	12,0 μ l
	Standard matrice 6-FAM	1,0 μ l
Campione matrice 2	Hi-Di Formamide	12,0 μ l
	Standard matrice BTG	1,0 μ l
Campione matrice 3	Hi-Di Formamide	12,0 μ l
	Standard matrice BTY	1,0 μ l
Campione matrice 4	Hi-Di Formamide	12,0 μ l
	Standard matrice BTR	1,0 μ l
Campione matrice 5	Hi-Di Formamide	12,0 μ l
	Standard matrice BTO	1,0 μ 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 7 riporta la lista d'iniezione per la generazione della matrice.**

Tabella 7. Lista d'iniezione per la generazione della matrice

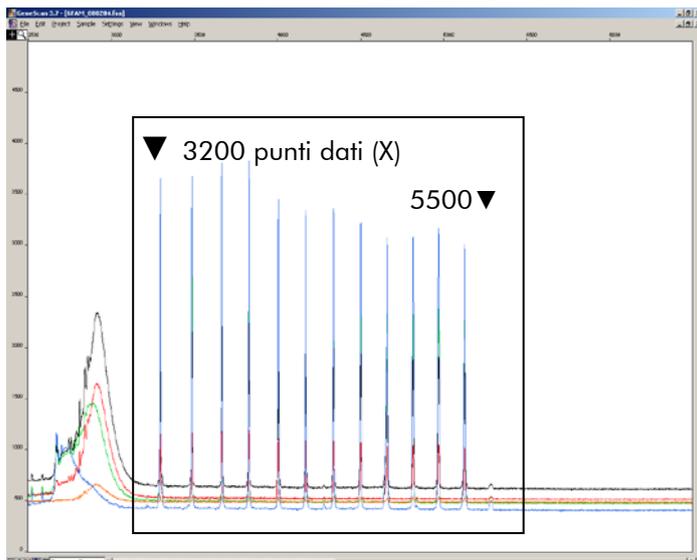
Parametro	Impostazioni
File modulo	GS STR POP-4 (1 ml) G5
File matrice	Nessuno
Size Standard	Nessuno*
Durata iniezione (s)	5
Voltaggio iniezione (kV)	15
Voltaggio ciclo (kV)	15
Temperatura ciclo (°C)	60
Durata ciclo (min)	24

* 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 (pagina successiva), dovrebbero esserci almeno 5 picchi con altezze di 1000–4000 RFU per ogni campione matrice.**

Nota: il range ottimale è 2000–4000 RFU.

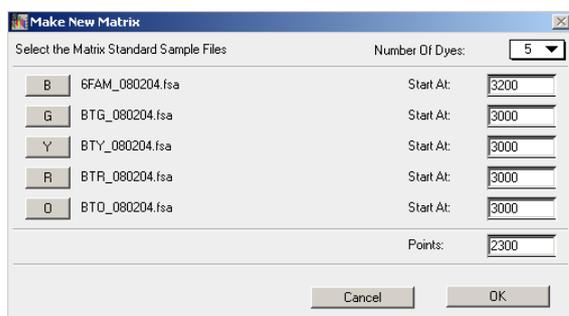


Elettroferogramma con i dati grezzi dello standard matrice 6-FAM.

- 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), inserire 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.

	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	0.3619	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".
2. Aprire la cartella del ciclo corrispondente e selezionare "Add Sample Files".
3. Selezionare uno o più campioni nella colonna File Sample (campione).
4. Cliccare "Sample" e poi "Install New Matrix" (Installa nuova matrice) per aprire la cartella matrici e selezionare una nuova matrice.
5. Ri-analizzare 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 come indicato nella Tabella 8.

Tabella 8. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard

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

2. Aliquotare 12 μ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.

3. **Aggiungere 1 μ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluito, 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.**

Configurazione del software GeneScan

Creare una Scheda Campione e immettervi la descrizione del campione.

Tabella 9. Lista di iniezione per ABI PRISM 310

Componente	Impostazioni
File modulo	GS STR POP-4 (1 ml) G5
File matrice	per es. Matrix BT5
Size Standard	per es. SST-BTO_60-500bp
Durata iniezione (s)	5*
Voltaggio iniezione (kV)	15
Voltaggio ciclo (kV)	15
Temperatura ciclo (°C)	60
Durata ciclo (min)	28 [†]

* 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.

[†] La durata del ciclo per Investigator ESSplex SE Plus è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 500 bp.

Parametri dell'analisi

La Tabella 10 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

Tabella 10. Parametri d'analisi raccomandati per ABI PRISM 310

Parametro	Impostazioni
Range analisi	Start: 2000 Stop: 10,000
Elaborazione dati	Baseline: controllata Multi-componente: controllata Opzioni smoothing: leggero
Rilevamento picchi	Soglie di ampiezza picchi B:* Y:* G:* R:* O:* Min. semilarghezza picco: 2 pts Grado polinomiale: 3 Misure finestra picco: 11 pts [†]
Range assegnazione taglia	Min: 60 Max: 550
Metodo di assegnazione taglia	Local Southern Method
Correzione separazione picco	Nessuno

* La soglia di ampiezza del picco (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che può essere rilevata dal software GeneScan o 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 3 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 lo strumento ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

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 Utente dello strumento ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer (*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 PRISM 3100.

Il set di filtri virtuali G5 è usato per l'applicazione combinata dei 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 11.

Tabella 11. Materiali occorrenti per l'elettroforesi

Materiale	Specifiche
Capillare	Serie capillare da 36 cm per ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Polimero	Polimero POP-4 per ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Tampone	Tampone 10x con EDTA per strumento Genetic Analyzer

Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Una corretta calibrazione spettrale è fondamentale per la valutazione di sistemi multicolori con lo strumento ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer 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 PRISM 3100-Avant)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 12.

Tabella 12. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 4 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	60 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 μ l

2. Caricare 12 μ 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 PRISM 3100)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 13.

Tabella 13. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 16 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	204 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 μ l

2. Caricare 12 μ 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 14. Editor piastra per calibrazione spettrale

Parametro	Impostazioni
Nome campione	Immettere un nome per i campioni matrice
Set coloranti	G5
Modulo ciclo spettrale	Predefinito (per es. Spect36_POP4)
Parametri spettrali	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (parametri creati in precedenza)

- 7. Cliccare sull'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 finestra 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 Utente dello strumento ABI PRISM 3100-Avant/ 3100 Genetic Analyzer.
- 10. Cliccare "OK" per confermare il completamento del ciclo.**

Controllo della matrice

- 1. Selezionare "Display Spectral Calibration" (Visualizza calibrazione spettrale) dal menu Tools, poi "Dye Set" 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 compreso tra 1 e 20. Entrambi i valori devono rientrare nel range predeterminato.**
- 3. Controllare che i campioni matrice abbiano una baseline piatta. In ogni campione matrice dovrebbero essere presenti 5 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, seguire le istruzioni della sezione "Parametro spettrale" a pag. 21.
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 come indicato nella Tabella 15.

Tabella 15. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard

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

2. Aliquotare 12 μ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.
3. Aggiungere 1 μ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluito, 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 μ 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 (shoulder peaks) o separati (split peaks), specie a basse temperature. Verificare che le condizioni

ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento.

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 ciclo appropriato come stampo dalla tabella GeneScan (vedere Tabella 16).**
- 3. Modificare il voltaggio 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_500bp). Confermare cliccando "OK".**
- 5. Cliccare "Close" (Chiudi) per uscire dall'Editor del modulo.**

Tabella 16. Modulo 3kV_10s_500bp per ABI PRISM 3100-Avant/3100

Parametro	Impostazione
Temperatura ciclo (°C)	Valore predefinito
Volume riempimento cap.	Valore predefinito
Corrente massima (A)	Valore predefinito
Tolleranza corrente (A)	Valore predefinito
Corrente ciclo (A)	Valore predefinito
Tolleranza voltaggio (kV)	Valore predefinito
Voltaggio pre-ciclo (kV)	Valore predefinito
Durata pre-ciclo (s)	Valore predefinito
Voltaggio iniezione (kV)	3,0
Durata iniezione (s)	10*
Voltaggio ciclo (kV)	Valore predefinito
Numero di fasi	Valore predefinito
Intervallo fase voltaggio	Valore predefinito
Durata ritardo dati (s)	Valore predefinito
Durata ciclo (min)	26 [†]

* 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.

[†] La durata del ciclo per Investigator ESSplex SE Plus è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 500 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" 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” come tipo di piastra e cliccare “Finish”.

Tabella 17. Impostazioni nell’editor piastra

Parametro	Impostazioni
Nome campione	Immettere un nome per i campioni matrice
Coloranti	○
Info colore	Ladder o campione
Nome progetto	per es. 3100_Project1
Set coloranti	G5
Modulo ciclo	3kV_10s_500bp*
Analisi modulo 1	DefaultAnalysis.gsp

* Vedere Tabella 16, “Modulo 3kV_10s_500bp per ABI PRISM 3100-Avant/3100”.

- 7. Completare la tabella nell’editor piastra e cliccare “OK”.**
- 8. Cliccare sull’intestazione della colonna per evidenziare tutta la colonna, quindi selezionare “Fill Down” 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 18 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

Tabella 18. Parametri d'analisi raccomandati per ABI PRISM 3100-Avant/3100.

Parametro	Impostazioni
Range analisi	Start: 2000 Stop: 10,000
Elaborazione dati	Baseline: controllata Multi-componente: controllata Opzioni smoothing: leggero
Rilevamento picchi	Soglie di ampiezza picchi B:* Y:* G:* R:* O:* Min. semilarghezza picco: 2 pts Grado polinomiale: 3 Misure finestra picco: 11 pts [†]
Range assegnazione taglia	Min: 60 Max: 550
Metodo di assegnazione taglia	Local Southern Method
Correzione separazione picco	Nessuno

* La soglia di ampiezza del picco (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che può essere rilevata dal software GeneScan o GeneMapper *ID*. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio. Raccomandazione: l'altezza minima del picco dovrebbe essere 3 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 lo strumento Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer

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 lo strumento Applied biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide*).

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

Il set di filtri virtuali Any5Dye è usato per l'applicazione combinata dei 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 19.

Tabella 19. Materiali occorrenti per l'elettroforesi

Materiale	Specifiche
Capillare	Serie capillare da 36 cm per Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Polimero	Polimero POP-4 per Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Tampone	Tampone 10x con EDTA per Genetic Analyzer

Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Prima di iniziare l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA si deve eseguire una calibrazione spettrale con i 5 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 piastra (Plate Manager)

- Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale e controllo della matrice

Preparazione degli standard di calibrazione spettrale

Esempio per 4 capillari (Applied Biosystems 3130)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 20.

Tabella 20. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 4 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	60 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 μ l

2. Caricare 12 μ 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 termociclature regolato su 4°C per raffreddare la piastra.

Esempio per 16 capillari (Applied Biosystems 3130xl)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 21.

Tabella 21. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 16 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	204 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 μ l

2. Caricare 12 μ 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 22 e cliccare "OK".**

Tabella 22. Protocollo dello strumento per la calibrazione spettrale

Editor protocollo	Impostazioni
Nome	Utente (per es. Spectral36_POP4_BT5)
Tipo	SPECTRAL (SPETTRALE)
Set coloranti	Any5Dye
Polimero	Utente (per es. POP4)*
Lunghezza serie	Utente (per es. 36cm)*
Chimica	Standard matrice
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 per aprire la finestra di dialogo "New Plate" (Nuova piastra).**
- 6. Immettere le informazioni della Tabella 23 e cliccare "OK". Nell'editor piastra si apre automaticamente una nuova tabella (Tabella 24).**

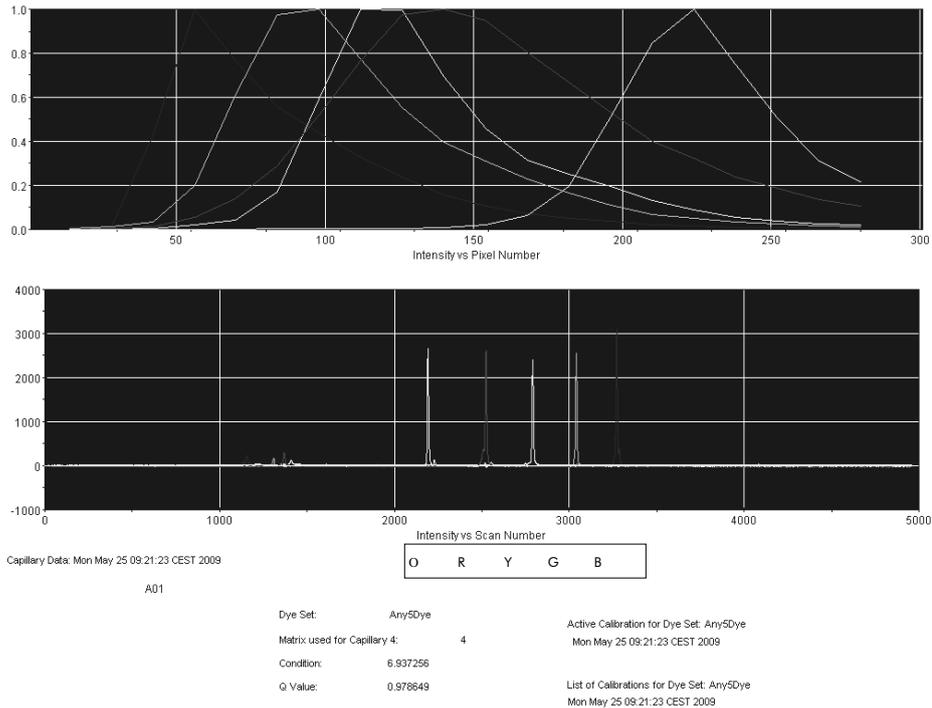
Tabella 23. Editor piastra per calibrazione spettrale (I)

Dialogo nuova piastra Impostazioni	
Name (Nome)	per es. Spectral_BT5_date
Applicazione	Calibrazione spettrale
Tipo di piastra	96 pozzetti
Nome proprietario/ nome operatore	...

Tabella 24. Editor piastra per calibrazione spettrale (II)

Parametro	Impostazioni
Nome campione	Immettere un nome per i campioni matrice
Priorità	per es. 100
Protocollo strumento 1	Spectral36_POP4_BT5 (impostazione descritta in precedenza)

- 7. Cliccare sull'intestazione della colonna per selezionare tutta la colonna, quindi selezionare "Fill Down" 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 di calibrazione spettrale con standard matrice BT5 su uno strumento Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

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 compreso tra 1 e 20.
2. Controllare che i campioni matrice abbiano una baseline piatta. Come mostrato dalla figura alla pagina precedente, in ogni campione matrice dovrebbero essere presenti 5 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 (Visualizzatore Spettro). Rinominare il file di calibrazione (per es. BT5_Date of calibration).

Preparazione del campione

1. **Preparare una miscela di formamide e DNA size standard come indicato nella Tabella 25.**

Tabella 25. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard

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

2. **Aliquotare 12 μ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.**
3. **Aggiungere 1 μ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluito, 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 μ l di Hi-Di Formamide.

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

Configurazione del software Data Collection

1. **Modificare il modulo del ciclo una volta per il primo ciclo. Cliccare "New" nel Module Manager del software Data Collection per aprire la finestra di dialogo Run Module Editor (Editor Modulo Ciclo).**

Nota: Modificare le impostazioni predefinite del modulo ciclo indicate in "HIDFragmentAnalysis36_POP4_1" con quelle indicate nella Tabella 26.

2. **Modificare il voltaggio di iniezione a 3 kV e la durata d'iniezione a 10 s (Tabella 26).**
3. **Cliccare "Save As", immettere un nome per il nuovo modulo (per es. 3kV_10s_500bp), e confermare cliccando "OK".**
4. **Cliccare "Close" per uscire dall'Editor del modulo.**

Tabella 26. Modulo 3kV_10s_500bp per Applied Biosystems 3130/3130xl

Parametro	Impostazioni
Temperatura forno (°C)	Valore predefinito
Volume riempimento polimero	Valore predefinito
Stabilità corrente (μ A)	Valore predefinito
Voltaggio pre-ciclo (kV)	Valore predefinito
Durata pre-ciclo (s)	Valore predefinito
Voltaggio iniezione (kV)	3,0
Durata iniezione (s)	10*
Voltaggio numero di fasi	Valore predefinito
Intervallo fase voltaggio	Valore predefinito
Durata ritardo dati (s)	Valore predefinito
Voltaggio ciclo (kV)	Valore predefinito
Durata ciclo (s)	1560 [†]

* 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.

[†] La durata del ciclo per Investigator ESSplex SE Plus è stata modificata in modo da poter analizzare frammenti di lunghezza fino a 500 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 Protocol Editor e immettere i dati della Tabella 27.**
4. **Cliccare "OK" per uscire dal Protocol Editor.**

Tabella 27. Impostazioni in Instrument Protocol

Editor protocollo	Impostazioni
Name (Nome)	Run36_POP4_BT5_26min
Type (Tipo)	REGULAR (NORMALE)
Modulo ciclo	3kV_10s_500bp*
Set coloranti	Any5Dye

* Vedere Tabella 26, "Modulo ciclo 3kV_10s_500bp per Applied Biosystems 3130/3130xl".

1. **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.**
2. **Immettere i dati della Tabella 28.**

Tabella 28. Plate Editor GeneMapper (I)

Editor protocollo	Impostazioni
Name	per es. Plate_BT5_Date
Applicazione	Selezionare l'applicazione GeneMapper
Tipo di piastra	96 pozzetti
Nome proprietario/ nome operatore	...

3. **Cliccare "OK" per aprire automaticamente una nuova tabella nel Plate Editor (Tabella 29).**
4. **Cliccare sull'intestazione della colonna per selezionare tutta la colonna. Selezionare "Fill Down" nel menu Edit per applicare i dati a tutti i campioni selezionati. Fare clic su "OK".**
5. **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 29. Plate Editor GeneMapper (II)

Parametro	Impostazioni
Nome campione	Immettere un nome per i campioni
Priorità	per es. 100 (valore predefinito)
Tipo di campione	Campione o ladder allelico
Size Standard	per es. SST-BTO_60-500bp
Pannello	per es. ESSplex_Panels
Metodo d'analisi	per es. Analysis_HID_3130
SnP Set	–
Definito da utente 1-3	–
Gruppo risultati 1	(Selezionare gruppo risultati)
Protocollo strumento 1	Run36_POP4_BT5_26min (impostazione descritta in precedenza)

- 6. Avviare il processo.**
- 7. Durante il processo, visualizzare Error Status (Stato errori) in Event Log (Log eventi) o esaminare la qualità dei dati grezzi per ogni capillare nel Capillaries Viewer (Visualizzatore Capillari) o in Cap/Array Viewer (Visualizzatore Cap/Serie).**
- 8. 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 30 elenca i parametri raccomandati per l'analisi.

Tabella 30. impostazioni raccomandate per Applied Biosystems 3130/3130xl

Parametro	Impostazioni
Algoritmo rilevamento picchi	Avanzato
Range	Analisi: range parziale Punto d'inizio: 2000; Punto stop: 10,000 Taglie: tutte le taglie
Smoothing e Baselining	Smoothing: leggero Finestra baseline: 51 pts
Metodo di assegnazione taglia	Local Southern Method
Rilevamento picchi	Soglie di ampiezza picchi B:* Y:* G:* R:* O:* Min. semilarghezza picco: 2 pts Grado polinomiale: 3 Misure finestra picco: 11 pts [†] 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 minima del picco dovrebbe essere 3 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 lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Per istruzioni dettagliate sul setup dello strumento, la calibrazione spettrale e l'applicazione del software Applied Biosystems 3500 Series Data Collection versione 1.0 e GeneMapper *ID-X* versione 1.2, fare riferimento alla Guida Utente per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers (*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*).

Il sistema con 8 capillari è l'Applied Biosystems 3500, quello con 24 capillari è l'Applied Biosystems 3500xL

Il set di filtri virtuali AnyDye è usato per l'applicazione combinata dei 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO. Questo standard matrice è noto come BT5.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati dalla Tabella 31.

Tabella 31. Materiali occorrenti per l'elettroforesi

Materiale	Specifiche
Capillare	Serie da 36 cm per Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polimero	POP-4 per Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Tampone	Recipiente tampone anodo (ABC) 3500 Series Recipiente tampone catodo (CBC) 3500 Series

Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Prima di effettuare l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA si deve eseguire una calibrazione spettrale con i 5 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR e BTO per ciascun analizzatore (Tabella 32). La procedura di calibrazione crea una matrice che è usata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

IMPORTANTE: La calibrazione spettrale deve essere eseguita per ogni nuova serie capillare.

La calibrazione spettrale comprende le seguenti fasi:

- Preparazione dello strumento
- Preparazione del set di coloranti BT5
- Preparazione della piastra di calibrazione standard

- Assemblaggio piastra e caricamento piastra nello strumento
- Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale
- Controllo della matrice

Preparazione dello strumento

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

Preparazione del set di coloranti BT5

Tabella 32. I 5 marker fluorescenti di BT5

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

Prima di eseguire la calibrazione spettrale, è necessario impostare un set di coloranti per lo Standard Matrice BT5.

1. **Per creare un nuovo set di coloranti, entrare in "Library" (Libreria) e selezionare "Analyze" (Analizza) e successivamente "Dye Sets" (Set Coloranti) e cliccare "Create" (Crea).**
2. **Inserire un "Dye Set Name" (Nome Set Coloranti), per esempio BT5.**
3. **Selezionare "Matrix Standard" (Standard Matrice) come chimica e "AnyDye Template" (Template AnyDye) come template di set di coloranti.**
4. **Disabilitare "Purple" (Viola) nel campo "Arrange Dyes" (Ordina coloranti). Verificare che tutti gli altri colori siano abilitati.**
5. **Alla voce "Calibration Peak Order" (Ordine picco di calibrazione) il colori devono essere ordinati nella maniera seguente: 5 – blu, 4 – verde, 3 – giallo, 2 – rosso e 1 – arancio.**
6. **Non modificare le impostazioni "Parameter" (Parametro).**

7. Cliccare "Save" per confermare le modifiche.

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 type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	0
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1

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

Configurazione del set di coloranti BT5

Preparazione della piastra di calibrazione standard

Esempio per 8 capillari (Applied Biosystems 3500)

1. Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 33.

Tabella 33. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 8 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	90 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	10 μ l

2. **Caricare 10 μ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizioni A1–H1.**
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 24 capillari (Applied Biosystems 3500xL)

1. **Preparare una miscela di formamide e standard matrice BT5 come indicato nella Tabella 34.**

Tabella 34. Preparazione della miscela di formamide e standard matrice BT5 per 24 capillari

Componente	Volume
Hi-Di Formamide	225 μ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	25 μ l

2. **Caricare 10 μ l della miscela sulla piastra da 96 pozzetti; per es. posizioni A1–H1, A2-H2 e A3-H3.**
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.

Assemblaggio piastra e caricamento piastra nello strumento

Le fasi necessarie sono descritte in maniera dettagliata nella Guida Utente per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers (*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*).

Esecuzione di un ciclo di calibrazione spettrale

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

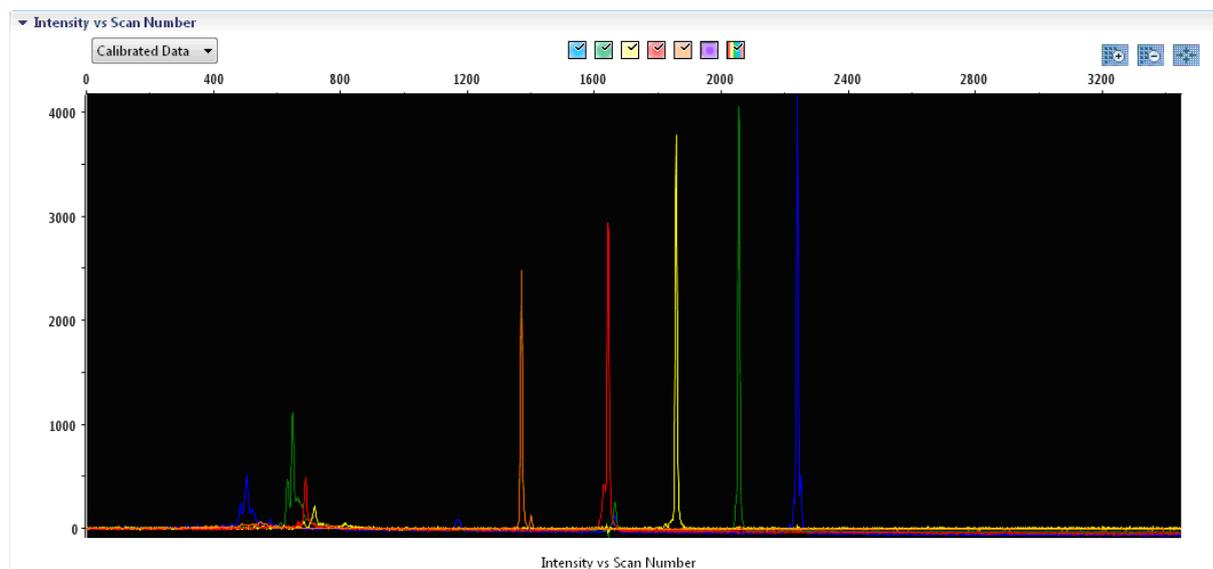
1. **Per accedere alla schermata della calibrazione spettrale, selezionare "Maintenance" (Manutenzione) sul dashboard del software 3500 Series Data Collection.**

2. È necessario specificare il numero di pozzetti della piastra di calibrazione spettrale e la loro collocazione sullo strumento.
3. Selezionare "Matrix Standard" come standard chimica e "BT5" per il set di coloranti.
4. Abilitare (opzionale) "Allow Borrowing" (Consenti acquisizione).
5. Cliccare su "Start Run" (Avvio analisi).

Controllo della matrice

Cliccare uno dei capillari della tabella per visualizzare i risultati relativi a ciascun capillare (dati spettro, valore qualità e numero di condizione) sotto alla tabella dei risultati dell'analisi.

- Il valore qualità (valore Q) di ogni capillare deve essere superiore a 0,8 e il numero di condizione (valore C) deve essere compreso tra 1 e 20.
- Controllare se i campioni matrice hanno una baseline piatta. Come mostrato dalla figura sotto, dovrebbero esserci almeno 5 picchi con altezze di circa 1000–5000 RFU per ogni campione matrice (**Nota:** il range ottimale è 2000–4000 RFU).



Elettroferogramma di calibrazione spettrale standard matrice BT5 su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Al termine della corretta esecuzione di una calibrazione spettrale, sulla riga "Overall" (Generale) i risultati sono visualizzati in verde. Se sulla riga "Overall" i risultati sono visualizzati in rosso, fare riferimento alla sezione "Risoluzione problemi di calibrazione spettrale" della Guida Utente per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers (*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*). .

▼ Capillary Run Data								
Capillary	1	2	3	4	5	6	7	8
Run 1	Passed							
Run 2	Not Calibrated							
Run 3	Not Calibrated							
Overall	Passed							

■ Passed
■ Failed
■ Borrowed
 Not Calibrated

Esempio di calibrazione spettrale corretta standard matrice BT5 per tutti i capillari su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

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

- L'ordine dei picchi nel profilo spettrale letto da sinistra a destra arancio-rosso-giallo-verde-blu
- Nel profilo dei dati grezzi non compare nessun picco estraneo
- La morfologia del picco nel profilo spettrale non presenta sovrapposizioni, cadute o altre irregolarità evidenti. Devono essere visibili picchi separati e distinti.

Se i dati soddisfano i requisiti di cui sopra, cliccare "Accept Results" (Accetta Risultati). Se i dati capillari non soddisfano i requisiti di cui sopra, cliccare "Reject Results" (Rifiuta Risultati) e fare riferimento alla sezione "Risoluzione problemi di calibrazione spettrale" della Guida Utente per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers (*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*).

Preparazione del campione

1. Preparare una miscela di formamide e DNA size standard come indicato nella Tabella 35.

Tabella 35. Preparazione di una miscela di formamide e DNA size standard

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

2. **Aliquotare 12 μ l di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.**
3. **Aggiungere 1 μ l di prodotto PCR o ladder allelico (diluito, 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 8 o 24 campioni sulla piastra degli analizzatori multicapillari. Se si analizza un numero inferiore di campioni, le posizioni vuote devono essere riempite con 12 μ l di Hi-Di Formamide.

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

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

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.

Configurazione di un processo

In caso di impiego di un kit Investigator ESSplex SE Plus su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer per la prima volta, è necessario impostare innanzitutto un numero di protocolli:

- Protocollo strumento
- Size Standard
- Protocollo QC
- Assay (Test)

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

1. **Per configurare il Protocollo Strumento, entrare in "Library" e selezionare "Analyze" e successivamente "Instrument Protocols" (Protocolli Strumento) e cliccare "Create".**

Nota: Modificare le impostazioni predefinite del Run Module da "HID36_POP4" come illustrato nella Tabella 36.

2. I parametri nella Tabella 36 devono essere inseriti o selezionati.

Tabella 36. Parametri protocollo strumento per Applied Biosystems 3500/3500xL

Parametro	Impostazione
Tipo di applicazione	HID
Lunghezza capillare	36 cm
Polimero	POP4
Set coloranti	per es. BT5
Modulo ciclo	HID36_POP4
Nome del protocollo	per es. Investigator ESSplex SE Plus
Temperatura forno (°C)	Valore predefinito
Voltaggio ciclo (kV)	Valore predefinito
Voltaggio pre-ciclo (kV)	Valore predefinito
Voltaggio iniezione (kV)	3,0
Durata ciclo (s)	1300
Tempo pre-ciclo (s)	Valore predefinito
Durata iniezione (s)	8,0*
Ritardo dati (s)	Valore predefinito
Opzioni Avanzate	Valore predefinito

* 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.

3. Cliccare "Save" per confermare le modifiche.

4. Per configurare il Size Standard, entrare in "Library" e selezionare "Analyze" e successivamente "Size Standard" e cliccare "Create".

5. I parametri nella Tabella 37 devono essere inseriti o selezionati.

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.

Tabella 37. Parametri size standard

Parametro	Impostazione
Size Standard	per es. SST-BTO_60-550
Colore colorante	Arancio

6. **Cliccare "Save" per confermare le modifiche.**
7. **Per configurare il Protocollo QC, entrare in "Library" e selezionare "Analyze" e successivamente "QC Protocols" (Protocolli QC) e cliccare "Create".**
8. **I parametri nella Tabella 38 devono essere inseriti o selezionati.**

Tabella 38. Parametri protocollo QC

Parametro	Impostazione
Nome del protocollo	per es. BTO_550
Size Standard	SST-BTO_60-500bp (dalla fase 4)
Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

9. **Entrare in "Analysis Settings" (Impostazioni analisi), selezionare "Peak Amplitude Threshold" (Soglia ampiezza picco) e disabilitare "Purple". Verificare che tutti gli altri colori siano abilitati.**

Verificare le impostazioni di analisi raccomandate nella Tabella 41. Tutte le altre impostazioni devono rimanere quelle predefinite.

10. **Cliccare "Save" per confermare le modifiche.**
11. **Per configurare un'analisi, entrare in "Library" e selezionare "Analyze" e successivamente "Assays" (Test) e cliccare "Create".**
12. **Per analizzare i frammenti di Investigator ESSplex SE Plus, è necessario selezionare i parametri indicati nella Tabella 39.**

Tabella 39. Parametri analisi

Parametro	Impostazione
Nome analisi	per es. Investigator ESSplex SE Plus
Colore	Valore predefinito
Tipo di applicazione	HID
Protocollo strumento	per es. Investigator ESSplex SE Plus (dalla fase 1)
Protocolli QC	per es. BTO_550 (dalla fase 7)

13. Cliccare "Save" per confermare le modifiche.

Avvio del processo

- 1. Sul dashboard, cliccare "Create New Plate" (Crea Nuova Piastra).**
- 2. Entrare in "Define Plate Properties" (Definisci Proprietà Piastra) e selezionare "Plate Details" (Caratteristiche Piastra). Selezionare o inserire i parametri nella Tabella 40.**

Tabella 40. Proprietà piastra

Proprietà	Impostazione
Nome	per es. Investigator ESSplex SE Plus
Numero di pozzetti	96
Tipo di piastra	HID
Lunghezza capillare	36 cm
Polimero	POP4

- 3. Cliccare "Assign Plate Contents" (Assegna Contenuti Piastra) per confermare le modifiche.**
- 4. Inserire il nome campione stabilito in ciascun pozzetto contenente un campione o un ladder allelico. Questo consentirà di identificare la posizione nel pozzetto di ciascun campione ai fini della raccolta e dell'elaborazione dei dati.**
- 5. Scegliere il test corretto per l'analisi. Se sono state seguite le fasi indicate in "Setting up the Run" (Configurazione del Ciclo), sarà Investigator ESSplex SE Plus a partire dalla fase 11. Tutti i pozzetti a**

cui è stato assegnato un nome sulla piastra dovranno essere associati a un'analisi.

6. Selezionare i pozzetti per i quali è necessario specificare un'analisi. Controllare la finestra accanto al nome analisi per assegnarlo ai pozzetti selezionati.
7. Ripetere (opzionale) per convenzioni nome file e gruppo risultati.
8. Qualora non si sia già proceduto, caricare la piastra assemblata nello strumento e chiudere il portello dello strumento per reinizializzarlo. Successivamente cliccare "Link Plate for Run" (Collega Piastra per il Ciclo). Nella schermata successiva, inserire il Nome Ciclo desiderato e cliccare "Start Run".

Parametri dell'analisi/metodo dell'analisi

La Tabella 41 elenca i parametri raccomandati per l'analisi nel foglio di lavoro Peak Detector (Rilevatore picchi).

Tabella 41. impostazioni raccomandate per Applied Biosystems 3500/3500xL

Parametro	Impostazioni
Algoritmo rilevamento picchi	Avanzato
Range	Analisi: range parziale Punto d'inizio: 1000; Punto stop: 20,000 Taglie: tutte le taglie
Smoothing e Baselining	Smoothing: leggero Finestra baseline: 51 pts
Metodo di assegnazione taglia	Local Southern Method
Rilevamento picchi	Soglie di ampiezza picchi B:* Y:* G:* R:* O:* Min. semilarghezza picco: 2 pts Grado polinomiale: 3 Misure finestra picco: 11 pts [†] 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 GeneMapperID-X versione 1.2. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio. Raccomandazione: l'altezza minima del picco dovrebbe essere 3 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.

Protocollo: analisi

Per le istruzioni generali sull'analisi automatica del campione, fare riferimento alle Guide Utente o di Lavoro specifiche del Software Investigator IDproof, Investigator IDproof Mixture, GeneScan, GeneMapper ID, o GeneMapper ID-X.

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; Figura 1) 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 550bp.

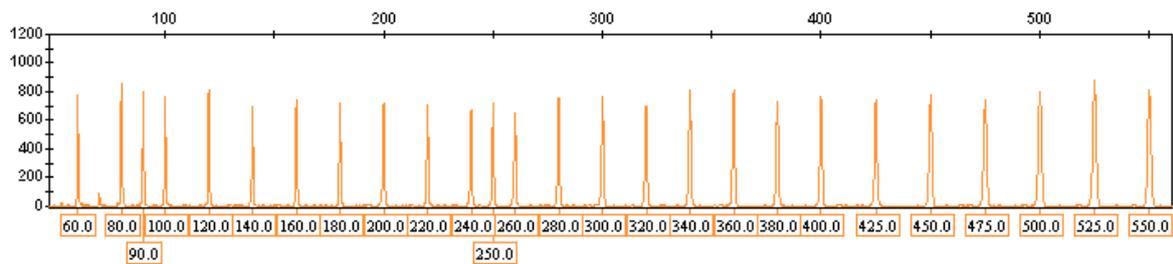


Figura 1. Elettroferogramma del DNA Size Standard 550 (BTO), frammenti con lunghezza in bp.

Software di analisi

L'assegnazione degli alleli deve essere eseguita mediante un software di analisi appropriato, per es. QIAGEN Investigator IDproof, IDproof Mixture, Genotyper, GeneMapper ID, o GeneMapper ID-X associato ai file template Investigator scaricabili dal sito www.qiagen.com o dal CD-ROM (cat. n° 389900), vedere Tabella 42 e Tabella 43.

Il file template Investigator per il software Genotyper è ESSplex SE.

Tabella 42. File template Investigator raccomandati per GeneMapper ID

Tipo di file	Nome file
Pannelli	ESSplex_SE_Plus_Panels
BinSets	ESSplex_SE_Plus_Bins
Size Standard	SST-BTO_60-500bp
Metodo d'analisi	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu
Impostazioni plot	Plots_5dyes
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 43. File template Investigator raccomandati per GeneMapper ID-X

Tipo di file	Nome file
Pannelli	ESSplex_SE_Plus_Panels_x
BinSets	ESSplex_SE_Plus_Bins_x
Stutter	ESSplex_SE_Plus_Stutter_x
Size Standard	SST-BTO_60-500bp
Metodo d'analisi	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3500
Impostazioni plot	Plots_5dyes
Impostazioni tabella	Analisi dati 310/Analisi dati 31xx

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

Controlli

Gli alleli elencati nella Tabella 44 rappresentano il DNA di controllo 9948 (incluso nel kit Investigator ESSplex SE Plus) e il DNA di altre linee cellulari standard disponibili in commercio.

Tabella 44. Assegnazione degli alleli del kit Investigator ESSplex SE Plus

Loco	CCR 9948	CCR 9947A	ATCC K-562	CCR 3657
Amelogenina	X/Y	X/X	X/X	X/Y
D1S1656	14/17	18,3/18,3	15/16	13/18,3
D2S441	11/12	10/14	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	17/17	18/22
D3S1358	15/17	14/15	16/16	16/18
D8S1179	12/13	13/13	12/12	15/16
D10S1248	12/15	13/15	12/12	14/16
D12S391	18/24	18/20	23/23	18/19
D16S539	11/11	11/12	11/12	13/13
D18S51	15/18	15/19	15/16	12/20
D19S433	13/14	14/15	14/14,2	13/14
D21S11	29/30	30/30	29/30/31	28/29
D22S1045	16/18	11/14	16/16	11/17
FGA	24/26	23/24	21/24	18/23
SE33	23,2/26,2	19/29,2	26,2/28,2	22,2/27,2
TH1	6/9,3	8/9,3	9,3/9,3	7/9,3
vWA	17/17	17/18	16/16	14/19

Per un'ulteriore conferma, la tabella sopra indica gli alleli del DNA di riferimento acquistati da Coriell Cell Repositories (CCR), 3 DNA di riferimento acquistati da CCR e ATCC fino allo standard di Szibor et al. (2003).

Alleli

La Tabella 45 illustra gli alleli del ladder allelico. Tutte le analisi sono state eseguite usando il 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: 70–480 bp
- Verticale: secondo l'intensità del segnale

Tabella 45. Frammenti di ladder allelico inclusi nel kit Investigator ESSplex SE Plus

Loco	Marker Colorante	Numeri ripetuti ladder allelico
Amelogenina	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 10.3, 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
D21S11	6-FAM	24, 24.2, 25, 26, 26.2, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 36, 36.2, 37
D16S539	BTG	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D1S1656	BTG	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17.3, 18.3, 19.3
D19S433	BTG	6.2, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2
SE33	BTG	6.3, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 15, 16*, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25, 25.2, 26.2, 27.2*, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 35, 36, 36.2, 37, 38, 49
D10S1248	BTY	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D12S391	BTY	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26

La tabella continua nella pagina seguente.

Continuazione tabella dalla pagina precedente.

Loco	Marker Colorante	Numeri ripetuti ladder allelico
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR	8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D18S51	BTR	8, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 14, 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, 19, 20, 21, 21.2, 22, 23, 23.2, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 33, 34, 37.2, 42.2, 44.2, 45.2, 47.2, 50.2

* Gli alleli sono evidenziati nel ladder allelico per facilitare l'orientamento.

Per informazioni sulle microvarianti non contenute nel Ladder Allelico Investigator ESSplex SE Plus, vedere il sito web del National Institute of Standards and Technology (NIST) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

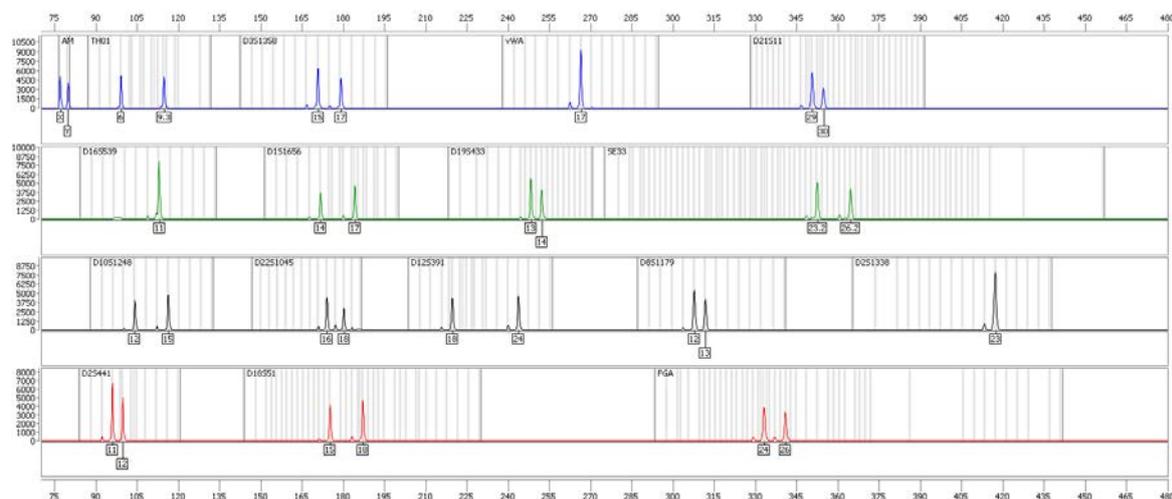


Figura 2. Elettroferogramma del kit Investigator ESSplex SE Plus ottenuto con 500 pg Control DNA 9948. L'analisi è stata effettuata su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. L'assegnazione degli alleli è stata effettuata mediante il software Investigator IDproof.

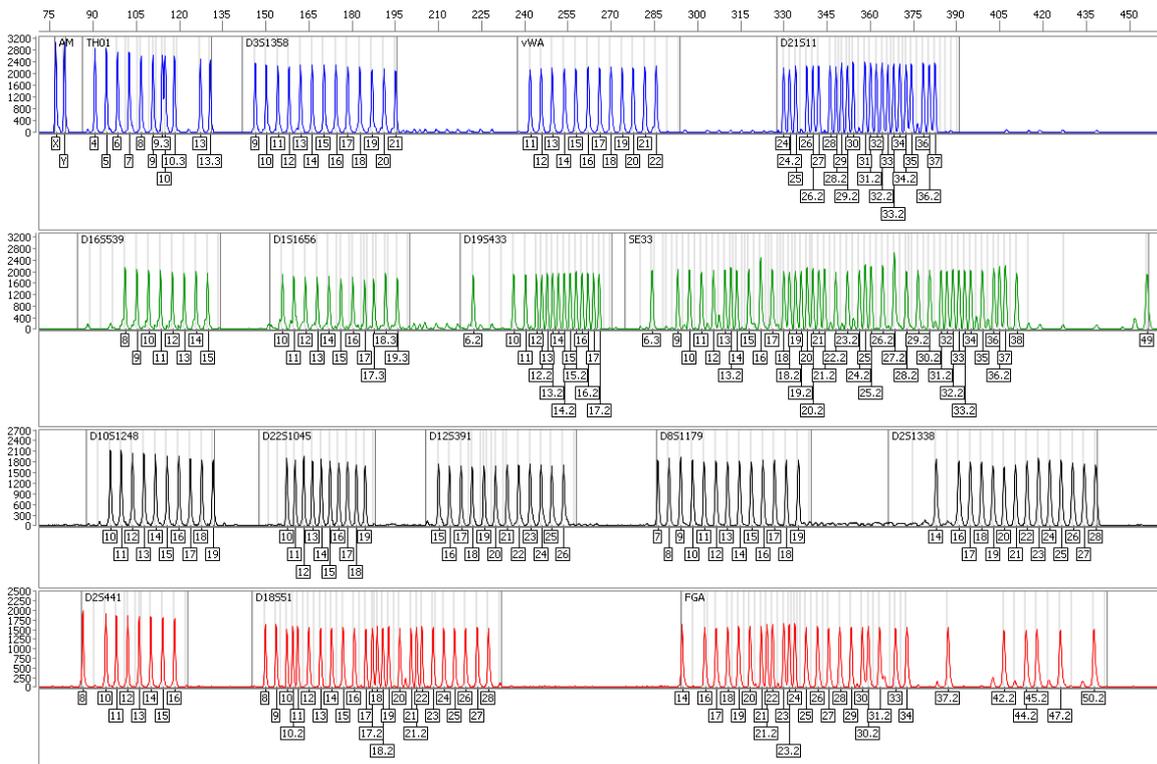


Figura 3. Elettroferogramma del ladder allelico ESSplex SE Plus analizzato su uno strumento Applied Biosystems 3500 Geneti Analyzer. L'assegnazione degli alleli è stata effettuata mediante il software Investigator IDproof.

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 (vedere "Guida alla Risoluzione dei Problemi", pagina 59) 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

La frequenza dei picchi di stutter dipende dalla sequenza della struttura di ripetizione e dal numero di 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 ESSplex SE Plus sono concepiti per minimizzare questi artefatti. 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. 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).

Commenti e suggerimenti

Preparazione del campione

L'intensità del segnale campione deve essere aumentata	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 di purificazione MinElute® PCR per una purificazione rapida ed efficace (vedere Informazioni per l'ordine).
--	---

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

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

a) Il DNA Size Standard 550 (BTO) non è stato correttamente definito o identificato	Cliccare sull'icona arancio "Size Match Editor" nella barra strumenti superiore del software GeneMapper ID o GeneMapper ID-X. Contrassegnare i frammenti arancio di tutti i campioni. Usare sempre il DNA Size Standard 550 incluso nei kit Investigator Human Identification PCR.
---	--

Commenti e suggerimenti

- 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/>5000 RFU)*, 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.
- 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.

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.
- Usare sempre il DNA Size Standard 550 per i kit Investigator Human Identification PCR.

* >4000 RFU per ABI PRISM 310; >5000 RFU per ABI PRISM 3100 e Applied Biosystems 3130/3500.

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 | <p>Il ladder allelico deve essere caricato sullo strumento analitico in concentrazione superiore a quella dei campioni da analizzare.</p> <p>In alternativa, i dati del ladder allelico possono essere analizzati con un valore inferiore di rilevamento dei picchi nel software d'analisi.</p> |
| c) Un solo picco del ladder allelico non è stato identificato perché fuori dal range di taglie (in bp) previsto dal software | <p>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.</p> |
| d) Non sono stati trovati alleli punto | <p>Gli alleli punto sono alleli con differenza di almeno 1 punto rispetto all'allele intero successivo. Controllare le impostazioni del metodo analitico. Ridurre a 11 punti il valore delle dimensioni della finestra picchi.</p> |

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 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. Int. J. Legal Med.* **110**, 175.

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. Int.* **53**, 73.

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

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Investigator ESSplex SE Plus Kit (100)	Miscela primer, miscela di reazione rapida con HotStarTaq <i>Plus</i> Polimerasi DNA, DNA di controllo, ladder allelico ESSplex SE Plus, DNA size standard 550 (BTO) e acqua nuclease-free	381545
Investigator ESSplex SE Plus Kit (400)	Miscela primer, miscela di reazione rapida con HotStarTaq <i>Plus</i> Polimerasi DNA, DNA di controllo, ladder allelico ESSplex SE Plus, DNA size standard 550 (BTO) e acqua nuclease-free	381547
Prodotti correlati		
Kit Investigator Human Identification PCR		
Investigator ESSplex Plus Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione rapida con HotStarTaq <i>Plus</i> Polimerasi DNA, DNA di controllo, ladder allelico ESSplex Plus, DNA size standard 550 (BTO) e acqua nuclease-free	381535
Investigator Nonaplex ESS Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381315
Investigator IDplex Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	381615
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione rapida con HotStarTaq <i>Plus</i> Polimerasi DNA, DNA di controllo DNA, ladder allelico IDplex Plus, DNA size standard 550 (BTO) e acqua nuclease-free	381625
Investigator HDplex Kit (25)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di 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 di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380315

* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori su richiesta.

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Kit Investigator Triplex DSF (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	380325
Investigator Argus X-12 Kit (25)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	383213
Investigator Argus Y-12 QS Kit (100)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	383615
Investigator DIPplex Kit (25)*	Miscela primer, miscela di reazione, DNA polimerasi, DNA di controllo, ladder allelico, DNA size standard e acqua nuclease-free	384013
Kit Investigator Quantification		
Investigator Quantiplex Kit (200)	Miscela primer IC FQ, miscela di reazione FQ, DNA di controllo Z1, tampone di diluizione	387016
Investigator Quantiplex HYres Kit	Miscela primer IC YQ, miscela di reazione FQ, DNA di controllo Z1, tampone di diluizione	387116
Accessori kit Investigator Human Identification PCR		
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
Software di analisi		
Investigator IDproof Software	Pacchetto software su CD comprensivo dei file di installazione per il desktop, versioni Server e Client del software IDproof	9020775
Investigator IDproof Demo Key	Uso gratuito della versione desktop IDproof del software per 30 giorni dall'installazione	389001
Prodotto	Contenuto	Cat. n°

* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori su richiesta.

Investigator IDproof Single Key	Consente l'uso illimitato della versione desktop del software; installabile su una sola workstation con database locale	389002
Investigator IDproof Server Key	Consente la configurazione di un server database e di varie workstation che accedono al database. Deve essere acquistato unitamente al Client Key	389003
Investigator IDproof Client Key	Deve essere acquistato unitamente al Server Key	389004
Investigator IDproof Mixture Software	Pacchetto software su CD comprensivo dei file di installazione per il desktop, versioni Server e Client del software IDproof Mixture	9020777
Investigator IDproof Mixture Demo Key	Uso gratuito della versione desktop IDproof Mixture del software per 30 giorni dall'installazione	389401
Investigator IDproof Mixture Single Key	Consente l'uso illimitato della versione desktop del software; installabile su una sola workstation con database locale	389402
Investigator IDproof Mixture Server Key	Consente la configurazione di un server database e di varie workstation che accedono al database. Deve essere acquistato unitamente al Client Key	389403
Investigator IDproof Mixture Client Key	Deve essere acquistato unitamente al Server Key	389404
Investigator Template Files	Tutti i file template per i kit Investigator Human Identification PCR da usare con il software <i>GeneMapper ID</i> , <i>GeneMapper ID-X</i> e <i>Genotyper</i> , nonché con il freeware <i>DIPSorter</i> (CD-ROM)	389900

Prodotto	Contenuto	Cat. n°
Estrazione e purificazione del DNA		
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 informazioni aggiornate sulla licenza e per 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 oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori su richiesta.

Marchi commerciali: QIAGEN®, HotStarTaq®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); 3500™, 6-FAM™, ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avant™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Genotyper®, Hi-Di™, POP-4™ (Applied Biosystems or its subsidiaries); Biometra® (Biometra medizinische Analytik GmbH); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (US Department of Health and Human Services). I marchi, nomi registrati, ecc., utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.

Contratto di Licenza Limitato per il kit Investigator ESSplex SE Plus

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto delle seguenti condizioni:

1. Il prodotto deve essere usato esclusivamente nel rispetto dei protocolli forniti con il prodotto e del presente manuale e 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 nei protocolli forniti col prodotto, il presente manuale e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati forniti da utenti di QIAGEN per gli utenti di QIAGEN. Questi protocolli sono stati accuratamente testati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non li garantisce e non assicura che non violino i diritti di terzi.
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 ed 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 indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2012 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgio ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brasile ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

Cina ■ techservice-cn@qiagen.com

Danimarca ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finlandia ■ techservice-nordic@qiagen.com

Francia ■ techservice-fr@qiagen.com

Germania ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Irlanda ■ techservice-uk@qiagen.com

Italia ■ techservice-it@qiagen.com

Giappone ■ techservice-jp@qiagen.com

Corea del Sud ■ techservice-kr@qiagen.com

Lussemburgo ■ techservice-bnl@qiagen.com

Messico ■ techservice-mx@qiagen.com

Paesi Bassi ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norvegia ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Svezia ■ techservice-nordic@qiagen.com

Svizzera ■ techservice-ch@qiagen.com

Regno Unito ■ techservice-uk@qiagen.com

USA (techservice-us@qiagen.com

