

Luty 2021 r.

# Instrukcja obsługi zestawu Investigator<sup>®</sup> ESSplex SE QS

Do multipleksowej amplifikacji europejskiego standardowego zestawu loci oraz locus SE33 i amelogeniny

Making improvements in life possible<sup>®</sup>

# Spis treści

Zawartość zestawu .....	4
Przechowywanie.....	5
Przeznaczenie .....	5
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	6
Kontrola jakości .....	6
Wstęp .....	7
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika .....	10
Protokół: Amplifikacja PCR.....	12
Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora ABI PRISM 3100- <i>Avant</i> /3100 Genetic Analyzer .....	15
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy .....	15
Przygotowanie próbki .....	19
Konfigurowanie oprogramowania GeneScan .....	20
Parametry analizy.....	24
Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer .....	25
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy .....	25
Przygotowanie próbki .....	30
Konfigurowanie oprogramowania do gromadzenia danych .....	31
Parametry/metoda analizy .....	35
Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer .....	36
Kalibracja widmowa/generowanie macierzy .....	37

---

Przygotowanie wzorcowej płytki kalibracyjnej dla 8 kapilar (analyzer Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer).....	38
Przygotowanie wzorcowej płytki kalibracyjnej dla 24 kapilar (analyzer Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer).....	38
Złożenie płytki i włożenie jej do aparatu .....	39
Przygotowanie próbki .....	43
Parametry/metoda analizy.....	49
Protokół: Analiza.....	51
Oprogramowanie do analizy.....	51
Kontrole.....	53
Czujnik jakości .....	54
Rozwiązywanie problemów .....	60
Literatura .....	63
Załącznik: Interpretacja wyników .....	64
Informacje dotyczące zamawiania.....	66
Historia zmian dokumentu .....	69

## Zawartość zestawu

<b>Investigator ESSplex SE QS Kit</b>	<b>(100)</b>	<b>(400)</b>
<b>Nr katalogowy</b>	<b>381575</b>	<b>381577</b>
<b>Liczba reakcji 25 µl</b>	<b>100</b>	<b>400</b>
Fast Reaction Mix 2.0 (Mieszanina do szybkiej reakcji 2.0)*	750 µl	4 x 750 µl
Primer Mix ESSplex SE QS (Mieszanina starterów ESSplex SE QS)	250 µl	4 x 250 µl
Nuclease-Free Water (Woda wolna od nukleaz)	1,9 ml	4 x 1,9 ml
Control DNA 9948 (Kontrolny DNA 9948) (0,1 ng/µl)	200 µl	200 µl
DNA Size Standard 550 (Wzorzec wielkości DNA 550) (BTO)	55 µl	220 µl
Allelic Ladder ESSplex SE QS (Drabina alleli ESSplex SE QS)	25 µl	3 x 25 µl

\* Zawiera polimerazę DNA, dezoksyrybonukleotydy (dNTP), MgCl<sub>2</sub> i albuminę surowicy bydlęcej.

---

# Przechowywanie

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

Po otwarciu zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 3 miesiące lub ponownie zamrozić i przechowywać przez dłuższy czas w zamrażarce o stałej temperaturze od -30 do -15°C.

# Przeznaczenie

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

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

# Informacje dotyczące bezpieczeństwa

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

## PRZESTROGA



NIE WOLNO dolewać wybielacza ani roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

# Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda partia zestawów Investigator ESSplex SE QS Kit przechodzi testy zgodności ze wstępnie określoną specyfikacją w celu zapewnienia spójnej jakości produktu. Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit spełnia wymogi normy ISO 18385.

# Wstęp

Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit stosowany jest do przeprowadzania multipleksowej reakcji PCR w ramach testów medycyny sądowej, oznaczania tożsamości osób oraz oznaczania ojcostwa. Dochodzi wówczas do jednoczesnej amplifikacji 16 polimorficznych markerów STR zalecanych przez Europejską Sieć Instytutów Nauk Sądowych (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) i Europejską Grupę Profilowania DNA (European DNA Profiling Group, EDNAP) jako nowy europejski standardowy zestaw loci (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11] oraz vWA), a także locus SE33 [ACTBP2] i swoistego dla płci locus amelogeniny.

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

Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit jest przeznaczony w szczególności do szybkiego generowania wiarygodnych profili DNA z próbek krwi, wymazów policzkowych oraz śladów kryminalistycznych. Zestaw wykorzystuje technologię reakcji PCR z szybkimi cyklami firmy QIAGEN, która pozwala na amplifikację w ciągu około 60 minut. Dzięki odczynnikom odpornym na działanie inhibitorów uzyskiwane są wysoce stabilne wyniki. Startery są wyznakowane fluorescencyjnie następującymi barwnikami:

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

---

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

Działanie zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit zwalidowano przy użyciu analizatora GeneAmp® PCR System 9700 (z 96-dołkowym srebrnym blokiem pokrytym złotem) oraz analizatora Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer.

W Tabeli 1 przedstawiono loci markerów STR wraz z ich mapowaniem chromosomalnym oraz motywami powtórzeń, zgodnymi z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (International Society for Forensic Genetics, ISFG) dotyczącymi zastosowania markerów mikrosatelitarnych (1).

Informacje dotyczące znanych mikrowariantów, które nie zostały zawarte w drabinie alleli Investigator ESSplex SE QS, można uzyskać na stronie amerykańskiego Narodowego Instytutu Standaryzacji i Technologii (National Institute of Standards and Technology, NIST) ([www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/)).



**Tabela 1. Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit — informacje dotyczące poszczególnych loci**

<b>Locus</b>	<b>Numer dostępu GenBank®</b>	<b>Motywy powtórzeń allele referencyjnego</b>	<b>Mapowanie chromosomalne</b>
Amelogenina X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amelogenina Y	M55419	–	Yp11.2
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] <sub>12</sub>	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] <sub>6</sub> [TTCC] <sub>11</sub>	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>	3p25.3
D8S1179	G08710	[TCTA] <sub>12</sub>	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] <sub>13</sub>	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT	12p13.2
D16S539	G07925	[GATA] <sub>11</sub>	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] <sub>13</sub>	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] <sub>11</sub>	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA [TCTA] <sub>3</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub>	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>	22q12.3
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTCT [CTTT] <sub>13</sub> CTCC [TTCC] <sub>2</sub>	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] <sub>9</sub>	11p15.5
vWA	M25858	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>	12p13.31

# Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

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

## Wszystkie protokoły

- Hi-Di Formamide, 25 ml (Applied Biosystems, nr kat. 4311320)
- Wzorce Matrix Standard BT5 do aparatów wielokapilarnych (QIAGEN, nr kat. 386123 lub 386125), do stosowania np. w aparatach ABI PRISM® 3100 oraz analizatorach Applied Biosystems 3130 i 3500 Series Genetic Analyzer
- Pipety i końcówki do pipet
  - Jeden z poniższych analizatorów DNA\*:
  - Analizator ABI PRISM 3100-*Avant*™/3100 Genetic Analyzer
  - Analizator Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer
  - Analizator Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
- Jeden z poniższych termocyklerów do reakcji PCR\*:
  - GeneAmp PCR System 9700
  - Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
  - ProFlex™ 96-well PCR System
  - QIAamplifier® 96
  - Biometra™ UNO-Thermobloc
  - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Probówki lub płytki do reakcji PCR
- Mikrowirówka do probówek lub płytek do reakcji PCR

\* Nie jest to wyczerpująca lista dostawców i nie zawiera wielu ważnych dostawców produktów do badań biologicznych.

---

## Oprogramowanie do analizy ważności produktów do stosowania przy identyfikacji osób

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

# Protokół: Amplifikacja PCR

Ten protokół jest przeznaczony do amplifikacji loci markerów STR za pomocą reakcji PCR z próbek kryminalistycznych przy użyciu zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit.

## Ważne czynności do wykonania przed rozpoczęciem procedury

- Wszystkie mieszaniny reakcyjne należy przygotowywać w miejscu oddzielnym od obszaru izolowania DNA oraz analizy produktów reakcji PCR (analizy po reakcji PCR).
- W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia krzyżowego należy stosować jednorazowe końcówki z filtrami hydrofobowymi.

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

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed otwarciem probówek z substratami reakcji PCR należy je wytrząsać i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.

## Procedura

1. Rozmrozić substraty reakcji PCR oraz matrycę kwasu nukleinowego.  
Dokładnie wymieszać. Krótko odwirować przed użyciem.
2. Przygotować mieszaninę Master Mix zgodnie z informacjami zawartymi w Tabeli 2.  
Ponieważ podczas przenoszenia może dochodzić do pewnej utraty odczynników, należy przygotować mieszaninę z uwzględnieniem dodatkowych reakcji. Należy również uwzględnić reakcje kontroli pozytywnej i negatywnej. Mieszanina Master Mix zawiera wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR oprócz matrycy DNA (próbki) oraz wody wolnej od nukleaz.
3. Dokładnie wymieszać mieszaninę Master Mix, krótko odwirować i rozdzielić odpowiednie objętości do probówek do reakcji PCR lub dołków płytki do reakcji PCR.

4. Dodać matrycę DNA i wodę wolną od nukleaz do mieszaniny Master Mix, aby uzyskać ostateczną objętość próbki wynoszącą 25 µl.
5. Przygotować kontrolę pozytywną i negatywną.
 

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

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

**Tabela 2. Przygotowanie mieszaniny Master Mix**

Składnik	Objętość na reakcję
Mieszanina do szybkiej reakcji 2.0	7,5 µl
Mieszanina starterów	2,5 µl
Woda wolna od nukleaz (dodawana w kroku 4)	Zmienna
Matryca DNA (dodawana w kroku 4)	Zmienna
Całkowita objętość	25 µl

6. Jeżeli podczas pipetowania matrycy DNA naniesiono ją na krawędź lub wieczko próbówki do reakcji PCR, próbówkę należy krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie.
7. Zaprogramować termocykler zgodnie z instrukcjami producenta, uwzględniając warunki podane w Tabeli 3.

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

**Tabela 3a. Protokół dla cykli standardowych**

Temperatura	Czas	Liczba cykli
98°C*	30 s	3 cykle
64°C	55 s	
72°C	5 s	
96°C	10 s	27 cykli
61°C	55 s	
72°C	5 s	
68°C	5 min	—
60°C	5 min	—
10°C	∞	—

\* Zastosować tzw. „gorący start” (hot start) w celu aktywacji polimerazy DNA.

**Tabela 3b. Protokół dla cykli opcjonalnych**

Temperatura	Czas	Liczba cykli
98°C*	30 s	3 cykle
64°C	55 s	
72°C	5 s	
96°C	10 s	27 cykli
61°C	55 s	
72°C	5 s	
68°C	2 min	—
60°C	2 min	—
10°C	∞	—

\* Zastosować tzw. „gorący start” (hot start) w celu aktywacji polimerazy DNA.

W Tabeli 3b wyszczególniono wcześniej opublikowane warunki cykli, które mogą być nadal stosowane, jeśli na elektroforegramach nie jest widoczna niepełna adenylacja.

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

# Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji aparatu, kalibracji widmowej, stosowania oprogramowania do gromadzenia danych ABI PRISM 3100 w wersji 1.01 lub 1.1 oraz oprogramowania GeneScan® zawiera *Podręcznik użytkownika analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer*.

Analizator ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer jest wyposażony w 4 kapilary, natomiast analizator ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer jest wyposażony w 16 kapilar.

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

Materiały wymagane do elektroforezy przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4. Materiały wymagane do elektroforezy**

<b>Materiał</b>	<b>Parametry techniczne</b>
Kapilara	Matryca z kapilarą o długości 36 cm do analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Polimer	Polimer POP-4® do analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Bufor	Bufor do analizatora genetycznego 10x z EDTA

## Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

Prawidłowa kalibracja widmowa ma ogromne znaczenie podczas oceny systemów wielobarwnych przy użyciu analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer i należy ją przeprowadzić przed przystąpieniem do analizy długości fragmentów. W wyniku procedury kalibracji tworzona jest macierz, której używa się do skorygowania zachodzenia na siebie widm emisji fluorescencji barwników.

Kalibracja widmowa obejmuje poniższe czynności:

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

Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej

Przykład z 4 kapilarami (analizator ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer):

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 5.

**Tabela 5. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 4 kapilar**

Składnik	Objętość
Hi-Di Formamide	60 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 µl

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

Przykład z 16 kapilarami (analizator ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer):

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 6.

**Tabela 6. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 16 kapilar**

Składnik	Objętość
Hi-Di Formamide	204 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 µl



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

## Wykonanie kalibracji widmowej

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

### Parametr widmowy

1. Aby zmienić ustawienia w pliku parametrów, przejść do poniższej ścieżki:  
„D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection SupportFiles\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles”
2. Wybrać element „MtxSTD{Genescan\_SetG5}”, aby otworzyć plik PAR.
3. Zmienić wartość parametru „Condition Bounds Range” (Zakres granic stanu) na [1,0, 20,0].
4. Jeżeli kalibracja się nie powiodła, zmienić również wartość parametrów Sensitivity (Czułość) na 0,1 i Quality (Jakość) na 0,8.
5. W menu „File” (Plik) wybrać polecenie „Save As” (Zapisz jako) i zapisać plik parametrów pod nową nazwą, np. MtxStd{Genescan\_SetG5\_BT5}.par.

**Uwaga:** Należy zawsze używać tego pliku parametrów do kalibracji widmowych wykorzystujących wzorzec Matrix Standard BT5 firmy QIAGEN.

### Okno Plate Editor (Edytor płytek) na potrzeby kalibracji widmowej

1. Umieścić 96-dołkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Uruchomić oprogramowanie do gromadzenia danych ABI PRISM 3100.

3. W widoku „Plate View” (Widok płytek) kliknąć opcję „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytek).
4. Wprowadzić nazwę płytki.
5. Wybrać opcję Spectral Calibration (Kalibracja widmowa).
6. Jako rodzaj płytki wybrać opcję „96-Well” (96-dołkowa) i kliknąć przycisk „Finish” (Zakończ).

**Tabela 7. Okno Plate Editor (Edytor płytek) na potrzeby kalibracji widmowej**

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

7. Kliknąć nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę, a następnie w menu „Edit” (Edycja) wybrać polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do zaznaczonych próbek. Potwierdzić, klikając przycisk „OK”.
8. Powiązać płytkę reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z identyfikatorem utworzonej płytki i rozpocząć cykl.
9. Po zakończeniu cyklu sprawdzić w oknie dialogowym „Spectral Calibration Result” (Wynik kalibracji widmowej), czy wszystkie kapilary pomyślnie przeszły kalibrację (etykieta A).  
Jeżeli poszczególne kapilary są oznaczone symbolem X, należy zapoznać się z informacjami opisanymi w *Podręczniku użytkownika analizatora ABI PRISM 3100-Avant/ 3100 Genetic Analyzer*.
10. Kliknąć przycisk „OK”, aby potwierdzić zakończenie cyklu.

## Sprawdzenie macierzy

1. W menu „Tools” (Narzędzia) wybrać najpierw polecenie „Display Spectral Calibration” (Wyświetl kalibrację widmową), a następnie opcję „Dye Set” (Zestaw barwników) i „G5”, aby sprawdzić profil kalibracji widmowej dla każdej kapilary.
2. Wartość jakości (wartość parametru Q) musi być większa niż 0,95, a wartość stanu (wartość parametru C) musi zawierać się w zakresie od 1 do 20. Obie wartości muszą zawierać się we wstępnie zdefiniowanym zakresie.
3. Sprawdzić, czy w próbkach macierzy nie występuje płaska linia bazowa. W każdej próbce macierzy powinno występować 5 pików o wysokości od 1000 do 5000 RFU.

**Uwaga:** Optymalny zakres to 2000–4000 RFU.

4. Sprawdzić nową macierz przy użyciu bieżących próbek. Przy użyciu nowej macierzy nie powinny występować przenikania się pików pomiędzy panelami barwników (B, G, Y, R i O, czyli niebieski, zielony, żółty, czerwony i pomarańczowy).
5. W razie niepowodzenia kalibracji należy wykonać instrukcje opisane w części „Parametr widmowy” na stronie 17.
6. Jeżeli wszystkie kapilary pomyślnie przeszły kalibrację, należy ręcznie aktywować ostatni plik kalibracji dla zestawu barwników Dye Set G5. W menu „Tools” (Narzędzia) kliknąć polecenie „Set Active Spectral Calibration” (Ustaw aktywną kalibrację widmową).
7. Zmienić nazwę pliku kalibracji w części Set Matrix Name (Ustaw nazwę macierzy) (np. BT5\_Data kalibracji).

## Przygotowanie próbki

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca wielkości DNA zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 8.

**Tabela 8. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca wielkości DNA**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
Hi-Di Formamide	12 $\mu$ l
Matrix Standard BT5 multi cap.	0,5 $\mu$ l

- Odmierzyć porcję mieszaniny o objętości 12  $\mu$ l do probówki dla każdej analizowanej próbki.
- Dodać 1  $\mu$ l produktu reakcji PCR lub drabiny alleli (w razie potrzeby po rozcieńczeniu).
- Prowadzić denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
- Wykonać zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.  
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.
- Załadować próbki na tacę.

Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych należy przy użyciu pipety nanieść 4 lub 16 próbek. Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy zapełnić, nanosząc po 12  $\mu$ l odczynnika Hi-Di Formamide.

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

Temperatura w pomieszczeniu może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w aparatach wielokapilarnych, powodując występowanie pików podrzędnych lub podzielonych (w szczególności dotyczy to niskich temperatur). Należy dopilnować utrzymania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta aparatu.

## Konfigurowanie oprogramowania GeneScan

- Przed pierwszym cyklem dokonać edycji domyślnego modułu cyklu w obrębie zestawu barwników Dye Set G5. Wybrać opcję „Module Editor” (Edytor modułów), aby otworzyć okno dialogowe.

- Wybrać odpowiednią opcję Run Module (Moduł cyklu) jako szablon w tabeli GeneScan (patrz Tabela 9).
- Zmienić wartości parametrów „Injection Voltage” (Napięcie iniekcji) na 2,5 kV, „Injection Time” (Czas iniekcji) na 30 s, „Run Voltage” (Napięcie cyklu) na 13 kV i „Run Time” (Czas cyklu) na 30 min.
- Kliknąć polecenie „Save As” (Zapisz jako) i wprowadzić nazwę nowego modułu (np. 2.5kV\_30s\_500bp). Potwierdzić, klikając przycisk „OK”.
- Kliknąć przycisk „Close” (Zamknij), aby zamknąć okno Run Module Editor (Edytor modułu cyklu).

**Tabela 9. Moduł cyklu 2.5kV\_30s\_500bp w analizatorze ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer**

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

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

† Zmodyfikowano czas cyklu dla zestawu Investigator ESSplex SE QS, aby umożliwić analizowanie fragmentów o długości do 500 pz.

## Rozpoczęcie cyklu

1. Umieścić przygotowaną 96-dółkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Uruchomić oprogramowanie do gromadzenia danych ABI PRISM 3100.
3. W widoku Plate View (Widok płytek) kliknąć opcję „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe Plate Editor (Edytor płytek).
4. Wprowadzić nazwę płytki.
5. Jako rodzaj zastosowania wybrać opcję „GeneScan”.
6. Jako rodzaj płytki wybrać opcję „96-Well” (96-dółkowa) i kliknąć przycisk „Finish” (Zakończ).

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

Parametr	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadzić nazwę próbek macierzy
Dyes (Barwniki)	O
Color Info (Informacje o kolorach)	Ladder (Drabina) lub Sample (Próbka)
Project Name (Nazwa projektu)	Np. 3100_Project1
Dye Set (Zestaw barwników)	G5
Run Module (Moduł cyklu)	2.5kV_30s_500bp*
Analysis Module 1 (Moduł analizy 1)	DefaultAnalysis.gsp

\* Patrz Tabela 9.

7. Wypełnić tabelę w oknie Plate Editor (Edytor płytek) i kliknąć przycisk „OK”.
8. Kliknąć nagłówek kolumny, aby zaznaczyć całą kolumnę, a następnie w menu „Edit” (Edycja) wybrać polecenie „Fill Down” (Wypełnij w dół), aby zastosować informacje do zaznaczonych próbek.
9. Powiązać płytkę reakcyjną na tacy automatycznego podajnika z identyfikatorem utworzonej płytki i rozpocząć cykl.

- 
10. Po zakończeniu cyklu wyświetlić dane, korzystając z opcji Color Data (Dane barwne) w widoku Array View (Widok macierzy) oprogramowania do gromadzenia danych (seria 3100) lub jako pliki przeanalizowanych próbek dostępne po otwarciu ścieżki: „D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns”.

## Parametry analizy

W Tabeli 11 wymieniono zalecane parametry analizy.

**Tabela 11. Zalecane parametry analizy dla analizatora ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer**

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

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

<sup>†</sup> Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna pików) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

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



# Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji aparatu, kalibracji widmowej lub stosowania oprogramowania do gromadzenia danych ABI PRISM w wersji 3.0 oraz oprogramowania GeneMapper *ID* zawiera *Instrukcja rozpoczynania pracy z analizatorami Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer*.

Analizator Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer jest wyposażony w 4 kapilary, natomiast analizator Applied Biosystems 3130x/ Genetic Analyzer jest wyposażony w 16 kapilar.

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

Materiały wymagane do elektroforezy wymieniono w Tabeli 12.

**Tabela 12. Materiały wymagane do elektroforezy**

<b>Materiał</b>	<b>Parametry techniczne</b>
Kapilara	Matryca z kapilarą o długości 36 cm do analizatora Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer
Polimer	Polimer POP-4 do analizatora Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer
Bufor	Bufor do analizatora genetycznego 10x z EDTA

## Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

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

Kalibracja widmowa obejmuje poniższe czynności:

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

### Przygotowanie wzorców kalibracji widmowej

Przykład z 4 kapilarami (analizator Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer):

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 13.

**Tabela 13. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 4 kapilar**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
Hi-Di Formamide	60 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 µl

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

Przykład z 16 kapilarami (analizator Applied Biosystems 3130x/ Genetic Analyzer):

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 14.

**Tabela 14. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 16 kapilar**

Składnik	Objętość
Hi-Di Formamide	204 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 µl

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

### Wykonywanie kalibracji widmowej

- Umieścić 96-dołkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
- W narzędziu Protocol Manager (Menedżer protokołów) oprogramowania do gromadzenia danych otworzyć okno „Instrument Protocol” (Protokół aparatu).
- Kliknąć przycisk „New” (Nowy), aby otworzyć okno dialogowe „Protocol Editor” (Edytor protokołów).
- Wypełnić okno dialogowe przy użyciu informacji zawartych w Tabeli 15 i kliknąć przycisk „OK”.

**Tabela 15. Protokół aparatu do kalibracji widmowej**

Edytor protokołów	Ustawienia
Name (Nazwa)	Określone przez użytkownika (np. Spectral36_POP4_BT5)
Type (Typ)	SPECTRAL (Widmowa)
Dye Set (Zestaw barwników)	Any5Dye (5 dowolnych barwników)
Polymer (Polimer)	Określone przez użytkownika (np. POP4)*
Array Length (Długość układu)	Określone przez użytkownika (np. 36 cm)*
Chemistry (Warunki chemiczne)	Wzorzec matrycy
Run Module (Moduł cyklu)	Domyślne (np. Spect36_POP4_1)*

\* Zależnie od rodzaju używanego polimeru i długości kapilary.

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

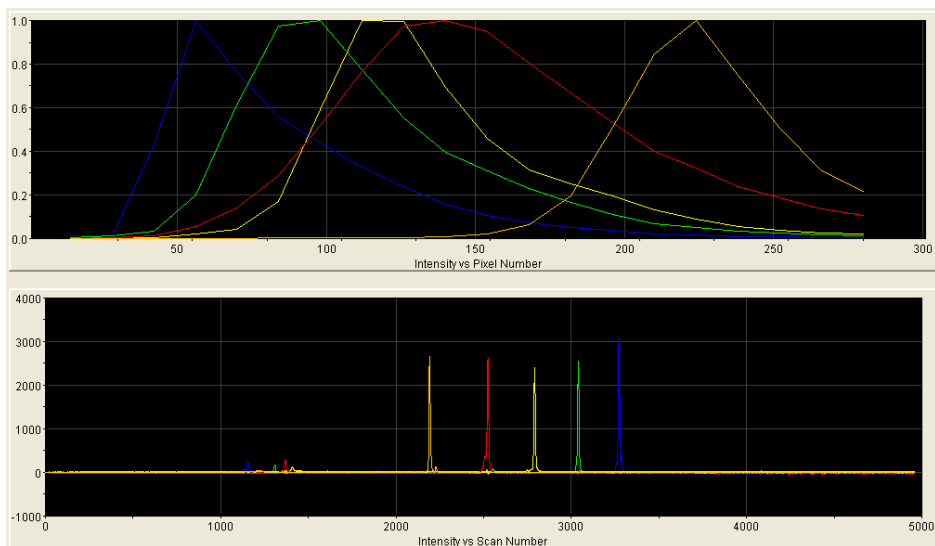
**Tabela 16. Okno Plate Editor (Edytor płytek) na potrzeby kalibracji widmowej (I)**

Okno dialogowe New plate (Nowa płytka)	Ustawienia
Name (Nazwa)	np. Spectral_BT5_data
Application (Zastosowanie)	Spectral Calibration (Kalibracja widmowa)
Plate Type (Rodzaj płytki)	96-well (96-dolkowa)
Owner Name/Operator Name (Imię i nazwisko właściciela/operatora)	–

**Tabela 17. Okno Plate Editor (Edytor płytek) na potrzeby kalibracji widmowej (II)**

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

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



Ryc. 1. Elektroforegram kalibracji widmowej z wzorcem Matrix Standard BT5 wykonanej przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

## Sprawdzenie macierzy

1. Wartość jakości (wartość parametru Q) każdej kapilary musi być większa niż 0,95, a wartość stanu (wartość parametru C) musi zawierać się w zakresie od 1 do 20.
2. Sprawdzić, czy w próbkach macierzy nie występuje płaska linia bazowa. Jak przedstawiono na Ryc. 1, w każdej próbce macierzy powinno występować 5 pików o wysokości około 1000–5000 RFU.

**Uwaga:** Optymalny zakres to 2000–4000 RFU.

3. Sprawdzić nową macierz przy użyciu bieżących próbek. Przy użyciu nowej macierzy nie powinny występować przenikania się pików pomiędzy panelami barwników (B, G, Y, R i O, czyli niebieski, zielony, żółty, czerwony i pomarańczowy).
4. W razie niepowodzenia kalibracji należy zastosować zoptymalizowane wartości wzorca Matrix Standard BT5 i powtórzyć cykl kalibracji.

5. Jeżeli wszystkie kapilary pomyślnie przeszły test, w oknie Spectral Viewer (Przeglądarka widmowa) automatycznie zostanie uaktywniony ostatni plik kalibracji dla zestawu barwników Any5Dye (5 dowolnych barwników). Zmienić nazwę pliku kalibracji (np. BT5\_Data kalibracji).

## Przygotowanie próbek

1. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca wielkości DNA zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 18.

**Tabela 18. Okno Plate Editor (Edytor płytek) na potrzeby kalibracji widmowej (II)**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
Hi-Di Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

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

Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych należy przy użyciu pipety nanieść 4 lub 16 próbek. Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy zapełnić, nanosząc po 12 µl odczynnika Hi-Di Formamide.

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

Temperatura w pomieszczeniu może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w aparatach wielokapilarnych, powodując występowanie pików podrzędnych lub podzielonych (w szczególności dotyczy to niskich temperatur). Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta aparatu.

## Konfigurowanie oprogramowania do gromadzenia danych

1. Przed pierwszym cyklem dokonać edycji domyślnego modułu cyklu. W narzędziu Module Manager (Menedżer modułów) oprogramowania do gromadzenia danych kliknąć przycisk „New” (Nowy), aby otworzyć okno dialogowe „Run Module Editor” (Edytor modułów cyklu).  
**Uwaga:** Zmienić ustawienia „Run Module Default” (Domyślne ustawienia modułu cyklu) z „HIDFragmentAnalysis36\_POP4\_1” na ustawienia wskazane w Tabeli 19.
2. Zmienić wartości parametrów „Injection Voltage” (Napięcie iniekcji) na 2,5 kV, „Injection Time” (Czas iniekcji) na 30 s, „Run Voltage” (Napięcie cyklu) na 13 kV i „Run Time” (Czas cyklu) na 1800 s (Tabela 19).
3. Kliknąć polecenie „Save As” (Zapisz jako), wprowadzić nazwę nowego modułu cyklu (np. 2.5kV\_30s\_500bp) i potwierdzić, klikając przycisk „OK”.
4. Kliknąć przycisk „Close” (Zamknij), aby zamknąć okno Run Module Editor (Edytor modułu cyklu).

**Tabela 19. Moduł cyklu 2.5kV\_30s\_500bp w analizatorze Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer**

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

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

† Zmodyfikowano czas cyklu dla zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit, aby umożliwić analizowanie fragmentów o długości do 500 pz.

## Rozpoczęcie cyklu

1. Umieścić przygotowaną 96-dolkową płytkę na tacy automatycznego podajnika.
2. Otworzyć narzędzie Protocol Manager (Menedżer protokołów) oprogramowania do gromadzenia danych.
3. W oknie „Instrument Protocol” (Protokół aparatu) kliknąć przycisk „New” (Nowy), aby otworzyć okno dialogowe „Protocol Editor” (Edytor protokołów) i wprowadzić informacje zawarte w Tabeli 20.
4. Kliknąć przycisk „OK”, aby zamknąć okno Protocol Editor (Edytor protokołów).

**Tabela 20. Ustawienia w oknie Instrument Protocol (Protokół aparatu)**

Edytor protokołów	Ustawienia
Name (Nazwa)	Run36_POP4_BT5_26min
Type (Typ)	REGULAR (Standardowy)
Run Module (Moduł cyklu)	2.5kV_30s_500bp*
Dye Set (Zestaw barwników)	Any5Dye (5 dowolnych barwników)

\* Patrz Tabela 19.

## Tworzenie definicji płytki

Przed każdym cyklem należy utworzyć definicję płytki.

1. W narzędziu Plate Manager (Menedżer płytek) oprogramowania do gromadzenia danych kliknąć przycisk „New” (Nowa), aby otworzyć okno dialogowe „New Plate” (Nowa płytka).
2. Wprowadzić informacje zawarte w Tabeli 21.



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

Edytor protokołów	Ustawienia
Name (Nazwa)	np. Plate_BT5_Data
Application (Zastosowanie)	Wybrać aplikację GeneMapper
Plate type (Rodzaj płytki)	96-well (96-dolkowa)
Owner Name/Operator Name (Imię i nazwisko właściciela/operatora)	–

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

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

Parametr	Ustawienia
Sample Name (Nazwa próbki)	Wprowadzić nazwę próbki
Priority (Priorytet)	np. 100 (ustawienie domyślne)
Sample Type (Typ próbki)	Sample (Próbka) lub Allelic Ladder (Drabina alleli)
Size Standard (Wzorzec wielkości)	np. SST-BTO_60-500bp
Panel	np. ESSplex_SE_QS_Panels
Analysis Method (Metoda analizy)	np. Analysis_HID_3130
Snps Set (Zestaw Snp)	–
User-defined 1–3 (Zdefiniowany przez użytkownika 1–3)	–
Results Group 1 (Grupa wyników 1)	(Wybrać grupę wyników)
Instrument Protocol 1 (Protokół aparatu 1)	Run36_POP4_BT5_26min (ustawienie opisane wcześniej)

- Rozpocząć cykl.

- 
7. W trakcie cyklu sprawdzić pozycję „Error Status” (Status błędu) w sekcji „Event Log” (Dziennik zdarzeń) lub sprawdzić jakość danych pierwotnych dla każdej kapilary w przeglądarce „Capillaries Viewer” (Przeglądarka kapilar) lub „Cap/Array Viewer” (Przeglądarka zamknięć/matrycy).
  8. Wyświetlić dane w widoku przeglądu w sekcji „Run History” (Historia cykli) lub „Cap/Array Viewer” (Przeglądarka zamknięć/matrycy) oprogramowania do gromadzenia danych.  
Dane cyklu są zapisywane w folderze Run (Cykl) wcześniej wybranej grupy wyników.

## Parametry/metoda analizy

W Tabeli 23 wymieniono zalecane parametry analizy.

**Tabela 23. Zalecane ustawienia dla analizatora Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer**

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

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

<sup>†</sup> Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna pików) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

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

# Protokół: Elektroforeza przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit zwalidowano do stosowania w analizatorze 3500/3500xL Genetic Analyzer, który wymaga następującego oprogramowania:

- oprogramowanie do gromadzenia danych (seria 3500) w wersji 1 lub 2
- HID Updater 3500 Data Collection w wersji 2.0

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

Szczegółowe instrukcje dotyczące konfiguracji aparatu, kalibracji widmowej lub stosowania oprogramowania do gromadzenia danych Applied Biosystems (seria 3500) w wersji 1 lub 2 oraz oprogramowania GeneMapper *ID-X* w wersji 1.2 zawiera *Przewodnik użytkownika analizatorów Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Analizator Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer jest wyposażony w 8 kapilar. Analizator Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer jest wyposażony w 24 kapilary.

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

Materiały wymagane do elektroforezy wymieniono w Tabeli 24.

**Tabela 24. Materiały wymagane do elektroforezy**

<b>Materiał</b>	<b>Parametry techniczne</b>
Kapilara	36-centymetrowa matryca do analizatora Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polimer	POP-4 do analizatora Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Bufor	Pojemnik z buforem Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Pojemnik z buforem Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

## Kalibracja widmowa/generowanie macierzy

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

**Ważne:** Kalibrację widmową należy wykonać dla każdej nowej matrycy kapilarnej. Składa się ona z następujących czynności:

- Przygotowanie aparatu
- Przygotowanie wzorcowej płytki kalibracyjnej
- Złożenie płytki i włożenie jej do aparatu
- Konfiguracja oprogramowania pod kątem zestawu barwników BT5
- Wykonanie kalibracji widmowej
- Sprawdzenie macierzy

### Przygotowanie aparatu

Przed procesem kalibracji widmowej należy upewnić się, że wykonano kalibrację przestrzenną. Ten proces szczegółowo opisano w *Przewodniku użytkownika analizatorów Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Tabela 25. 5 fluorescencyjnych znaczników zestawu BT5

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

## Przygotowanie wzorcowej płytki kalibracyjnej dla 8 kapilar (analizator Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Przed otwarciem probówek należy je wytrząsać i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 26.

**Tabela 26. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 8 kapilar**

Składnik	Objętość
Hi-Di Formamide	90 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	10 µl

3. Wytrząsnąć, a następnie krótko odwirować mieszaninę.
4. Przenieść 10 µl mieszaniny do każdego z 8 dołków płytki 96-dołkowej w pozycjach A1–H1.
5. Prowadzić denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
6. Wykonać zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.  
Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

## Przygotowanie wzorcowej płytki kalibracyjnej dla 24 kapilar (analizator Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

1. Przed otwarciem probówek należy je wytrząsać i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 27.

**Tabela 27. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca Matrix Standard BT5 dla 24 kapilar**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
Hi-Di Formamide	225 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	25 µl

3. Wyrzucić, a następnie krótko odwirować mieszaninę.
4. Przenieść 10 µl mieszaniny do każdego z 24 dołków płytki 96-dołkowej w pozycjach A1–H1, A2–H2 i A3–H3.
5. Prowadzić denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
6. Wykonać zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty. Alternatywnie do ostudzenia płytki można użyć termocyklera ustawionego na 4°C.

## Złożenie płytki i włożenie jej do aparatu

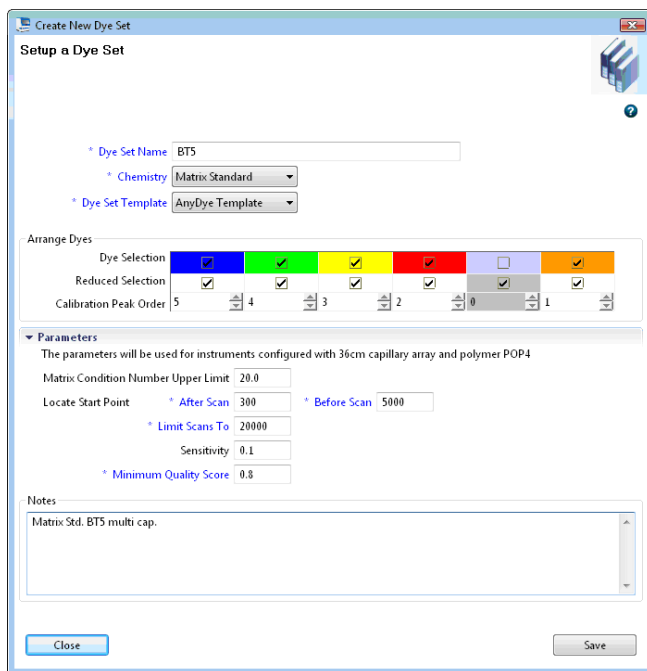
Wymagane czynności szczegółowo opisano w *Przewodniku użytkownika analizatorów Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

## Konfiguracja oprogramowania pod kątem zestawu barwników BT5

Przed kalibracją widmową należy skonfigurować zestaw barwników dla wzorca Matrix Standard BT5.

1. Aby utworzyć nowy zestaw barwników, wybrać opcję „Library” (Biblioteka). W części „Analyse” (Analiza) przejść do opcji „Dye Sets” (Zestawy barwników) i kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
2. W polu „Dye Set Name” (Nazwa zestawu barwników) wprowadzić nazwę, np. BT5.
3. W polu Chemistry (Warunki chemiczne) wybrać opcję Matrix Standard (Wzorzec matrycy) oraz ustawić parametr AnyDye Template (Szablon dowolnego barwnika) opcji Dye Set Template (Szablon zestawu barwników).

4. W polu „Arrange Dyes” (Rozmieść barwniki) wyłączyć opcję „Purple” (Fioletowy). Upewnić się, że włączone są wszystkie pozostałe kolory.
5. W części „Calibration Peak Order” (Kolejność pików kalibracji) kolory muszą być rozmieszczone w następujący sposób: 5 — niebieski, 4 — zielony, 3 — żółty, 2 — czerwony i 1 — pomarańczowy.
6. Nie wolno zmieniać ustawień zawartych w części „Parameter” (Parametry).
7. Kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.



Ryc. 2. Konfiguracja zestawu barwników BT5.

## Wykonanie kalibracji widmowej

Po umieszczeniu płytek wielodołkowych zawierających mieszaninę do kalibracji widmowej na tacy automatycznego podajnika można rozpocząć proces kalibracji widmowej.

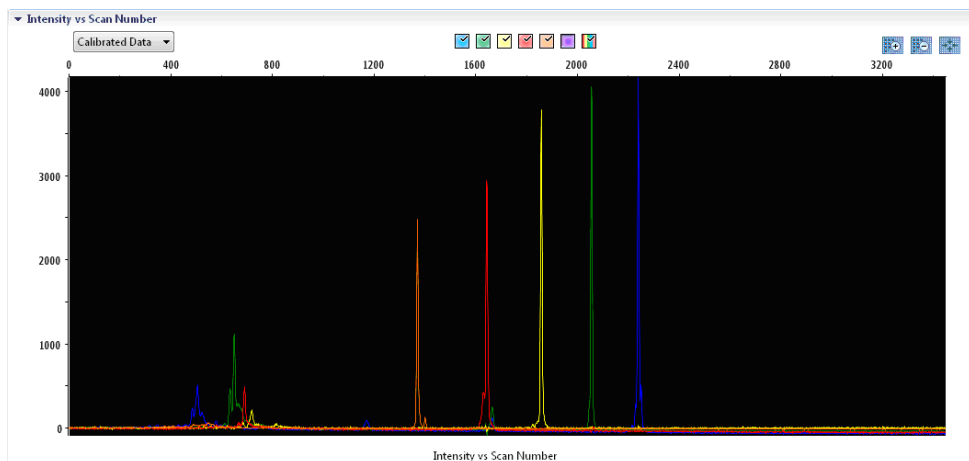


1. Aby uzyskać dostęp do ekranu Spectral Calibration (Kalibracja widmowa), wybrać opcję „Maintenance” (Konserwacja) na panelu kontrolnym oprogramowania do gromadzenia danych (seria 3500).
2. Aby skonfigurować cykl kalibracji, przejść do części „Calibrate” (Kalibracja), a następnie do części „Spectral” (Widmowa) i wybrać opcję „Calibration Run” (Cykl kalibracji).
3. Należy określić liczbę dołków płytki kalibracji widmowej oraz pozycję w obrębie aparatu.
4. W polu „Chemistry Standard” (Wzorzec warunków chemicznych) wybrać opcję „Matrix Standard” (Wzorzec matrycy), a w polu „Dye Set” (Zestaw barwników) wybrać na przykład wcześniej utworzony zestaw BT5 (w kroku 2).
5. (Opcjonalnie) Aktywować funkcję „Allow Borrowing” (Pozwalaj na pożyczki).
6. Kliknąć przycisk Start Run (Rozpocznij cykl).

## Sprawdzenie macierzy

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

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



Ryc. 3. Elektroforegram kalibracji widmowej z wzorcem Matrix Standard BT5 wykonanej przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Po pomyślnym ukończeniu procesu kalibracji widmowej w wierszu „Overall” (Ogółem) pojawiają się zielone wyniki. Jeżeli w wierszu „Overall” (Ogółem) wyświetlane są czerwone wyniki, należy zapoznać się z częścią „Spectral calibration troubleshooting” (Rozwiązywanie problemów związanych z kalibracją widmową) *Przewodnika użytkownika analizatorów Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

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

■ Passed   
 ■ Failed   
 ■ Borrowed   
  Not Calibrated

Ryc. 4. Przykład pomyślnej kalibracji widmowej z wzorcem Matrix Standard BT5 dla wszystkich kapilar analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Dla każdej kapilary wybrać i wyświetlić dane widmowe i pierwotne. Sprawdzić, czy dane spełniają poniższe kryteria:

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

Jeżeli dane dla wszystkich kapilar spełniają powyższe kryteria, kliknąć polecenie „Accept” (Akceptuj). Jeżeli dane jakiegokolwiek kapilary nie spełniają powyższych kryteriów, kliknąć polecenie „Reject” (Odrzuć) i zapoznać się z częścią „Spectral calibration troubleshooting” (Rozwiązywanie problemów związanych z kalibracją widmową) *Przewodnika użytkownika analizatorów Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

## Przygotowanie próbek

1. Przed otwarciem probówek należy je wytrząsać i krótko odwirować w celu zebrania zawartości na dnie probówek.
2. Przygotować mieszaninę formamidu i wzorca wielkości DNA zgodnie z wytycznymi zawartymi w Tabeli 28.
3. Wytrząsnąć, a następnie krótko odwirować mieszaninę.
4. Odmierzyć porcję mieszaniny o objętości 12 µl do probówki dla każdej analizowanej próbki.
5. Dodać 1 µl produktu reakcji PCR lub drabiny alleli (w razie potrzeby po rozcieńczeniu).
6. Prowadzić denaturację przez 3 minuty w temperaturze 95°C.
7. Wykonać zamrożenie błyskawiczne przez umieszczenie płytki na lodzie na 3 minuty.  
Do ostudzenia płytki można zamiast tego użyć termocyklera ustawionego na 4°C.
8. Załadować próbki na tacę.

**Tabela 28. Przygotowanie mieszaniny formamidu i wzorca wielkości DNA**

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

**Uwaga:** Ponieważ iniekcja jest wykonywana jednocześnie dla wszystkich kapilar, na płytkę analizatorów wielokapilarnych należy przy użyciu pipety nanieść przynajmniej 1 całą kolumnę (protokół z 8 próbkami) lub 3 całe kolumny (protokół z 24 próbkami). Jeżeli analizowana jest mniejsza liczba próbek, puste pozycje należy zapełnić, nanosząc po 12 µl odczynnika Hi-Di Formamide.

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

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

**Ważne:** Rzeczywista temperatura w pomieszczeniu może wpływać na oznaczanie produktów reakcji PCR w aparatach wielokapilarnych, powodując występowanie pików podrzędnych lub podzielonych (w szczególności dotyczy to niskich temperatur). Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta aparatu. Należy również upewnić się, że bufony osiągnęły temperaturę otoczenia.

## Konfiguracja cyklu

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

- Instrument Protocol (Protokół aparatu)
- Size Standard (Wzorzec wielkości)
- QC Protocol (Protokół kontroli jakości)
- Assay (Oznaczenie)

Wszystkie protokoły można skonfigurować za pośrednictwem panelu kontrolnego oprogramowania do gromadzenia danych (seria 3500).

## Protokół aparatu

1. Aby skonfigurować opcję Instrument Protocol (Protokół aparatu), przejść do części „Library” (Biblioteka), a następnie do części „Analyze” (Analiza) w sekcji „Instrument Protocols” (Protokoły aparatu). Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).

**Uwaga:** Zmienić ustawienia „Run Module Default” (Domyślne ustawienia modułu cyklu) z „HID36\_POP4” na ustawienia wskazane w Tabeli 29.

2. W przypadku analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer należy wprowadzić lub wybrać parametry wymienione w Tabeli 29. W przypadku analizatora Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer należy wprowadzić lub wybrać parametry wymienione w Tabeli 30.
3. Kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

**Tabela 29. Parametry protokołu dla analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer**

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

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

**Tabela 30. Parametry protokołu dla analizatora Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer**

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

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

## Wzorzec wielkości

1. Aby skonfigurować opcję Size Standard (Wzorzec wielkości), przejść do części „Library” (Biblioteka), a następnie do części „Analyze” (Analiza) w sekcji „Size Standards” (Wzorce wielkości) i kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
2. Należy wprowadzić lub wybrać parametry z Tabeli 30.  
Wzorca DNA Size Standard 550 (BTO) należy używać z fragmentami o następujących długościach: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 i 550 pz.
3. Alternatywnie należy zaimportować parametry wzorca DNA Size Standard 550 (BTO) przy użyciu zalecanego pliku szablonu Investigator „SST-BTO\_60-500bp” (Tabela 31).

4. Kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

**Tabela 31. Parametry wzorca wielkości**

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

## Protokół kontroli jakości

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

**Tabela 32. Parametry protokołu kontroli jakości**

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

3. Przejść do części „Analysis Settings” (Ustawienia analizy), a następnie do sekcji „Peak Amplitude Threshold” (Wartość progowa amplitudy piku) i wyłączyć opcję „Purple” (Fioletowy). Upewnić się, że włączone są wszystkie pozostałe kolory.

Sprawdzić zalecane ustawienia analizy zawarte w Tabeli 35 na stronie 50. Wszystkie pozostałe ustawienia powinny pozostać zgodne z ustawieniami domyślnymi.

4. Kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

## Oznaczenie

1. Aby skonfigurować opcję Assay (Oznaczenie), przejść do części „Library” (Biblioteka) w sekcji „Manage” (Zarządzanie). Wybrać element „Assays” (Oznaczenia) i kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).

Aby analizować fragmenty zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit, konieczne jest wybranie parametrów zawartych w Tabeli 33.

2. Kliknąć przycisk „Save” (Zapisz), aby potwierdzić zmiany.

**Tabela 33. Parametry oznaczenia**

Parametr	Ustawienia
Assay Name (Nazwa oznaczenia)	np. Investigator ESSplex SE QS
Color (Kolor)	Domyślne
Application Type (Zastosowanie)	HID
Instrument Protocol (Protokół aparatu)	np. Investigator ESSplex SE QS
QC Protocols (Protokoły kontroli jakości)	np. BTO_550

## Rozpoczęcie cyklu

1. Na panelu kontrolnym kliknąć polecenie „Create New Plate” (Utwórz nową płytkę).
2. Przejść do części „Setup” (Konfiguracja), a następnie do sekcji „Define Plate Properties” (Definiowanie właściwości płytki) i wybrać opcję „Plate Details” (Szczegóły płytki). Wybrać lub wprowadzić parametry zawarte w Tabeli 34.

**Tabela 34. Właściwości płytki**

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



3. Kliknąć przycisk „Assign Plate Contents” (Przypisz zawartość płytki), aby potwierdzić wprowadzone zmiany.
4. Wprowadzić wyznaczoną nazwę próbki dla każdego dołka zawierającego próbkę lub drabinę alleli. Zidentyfikuje to pozycje dołków z wszystkimi próbkami przeznaczonymi do gromadzenia i przetwarzania danych.
5. W części „Assay” (Oznaczenie) wybrać odpowiednie oznaczenie do przeprowadzenia analizy. Jeżeli wykonano wszystkie czynności z sekcji „Konfiguracja cyklu”, kliknąć przycisk „Add from Library” (Dodaj z biblioteki) i dla opcji Instrument Protocol (Protokół aparatu) wybrać protokół Investigator ESSplex SE QS. Należy przypisać oznaczenie do każdego z nazwanych dołków na płytce.
6. Powtórzyć opisane czynności w odniesieniu do opcji File name conventions (Konwencje nazw plików) oraz Results group (Grupa wyników).
7. Wybrać dołki, dla których ma zostać określone oznaczenie. Zaznacz pola obok wartości „Assay” (Oznaczenie), „File name conventions” (Konwencje nazw plików) i „Results group” (Grupa wyników), aby je przypisać do wybranych dołków.
8. Jeżeli jeszcze tego nie wykonano, załadować złożoną płytkę do aparatu i zamknąć drzwiczki aparatu, aby go ponownie zainicjować. Następnie kliknąć polecenie „Link Plate for Run” (Powiąz płytkę dla cyklu). Na kolejnym ekranie wprowadzić żądaną nazwę w polu Run Name (Nazwa cyklu) i kliknąć przycisk „Start Run” (Rozpocznij cykl).

## Parametry/metoda analizy

W Tabeli 36 wymieniono zalecane parametry analizy dla arkusza roboczego Peak Detector (Detektor pików).

**Tabela 35. Zalecane ustawienia dla analizatora Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer**

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

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

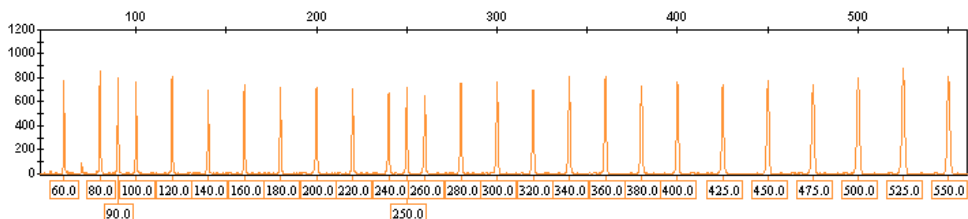
**Zalecenie:** Minimalna wysokość pików powinna być trzy razy większa od szumu tła linii bazowej.

<sup>†</sup> Tylko ustawienie parametru Peak Window Size (Rozmiar okna pików) różni się od wartości domyślnych firmy Applied Biosystems dla analizy HID.

# Protokół: Analiza

Ogólne instrukcje dotyczące automatycznej analizy próbek można znaleźć w odpowiednich przewodnikach użytkownika oprogramowania GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X*.

Wyznaczenie dokładnych długości amplifikowanych produktów zależy od rodzaju urządzenia, warunków elektroforezy oraz użytego wzorca wielkości DNA. Z powodu złożoności niektórych loci określenie wielkości należy opierać na równomiernie rozłożonych elementach referencyjnych. Wzorca DNA Size Standard 550 (BTO; Ryc. 5) należy używać z fragmentami o następujących długościach: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 i 550 pz.



Ryc. 5. Elektroforegram wzorca DNA Size Standard 550 (BTO), fragmenty z długościami wyrażonymi w pz (pary zasad).

## Oprogramowanie do analizy

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

**Tabela 36. Zalecane pliki szablonów Investigator dla analizatora GeneMapper ID**

<b>Parametr</b>	<b>Ustawienia</b>
Panels (Panele)	ESSplex_SE_QS_Panels
BinSets (Zestawy kontenerów)	ESSplex_SE_QS_Bins
Size standard (Wzorzec wielkości)	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Metoda analizy)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu
Plot Settings (Ustawienia wykresu)	Plots_5dyes

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

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

<b>Parametr</b>	<b>Ustawienia</b>
Panels (Panele)	ESSplex_SE_QS_Panels_x
BinSets (Zestawy kontenerów)	ESSplex_SE_QS_Bins_x
Piki satelitarne (Stutter)	ESSplex_SE_QS_Stutter_x
Size standard (Wzorzec wielkości)	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Metoda analizy)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Plot Settings (Ustawienia wykresu)	Plots_5dyes

## Kontrole

Allele podane w Tabeli 38 reprezentują kontrolny DNA 9948 (zawarty w zestawie Investigator ESSplex SE QS Kit) oraz DNA z innych komercyjnie dostępnych standardowych linii komórkowych.

**Tabela 38. Przypisanie alleli dla zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit**

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

W celu dodatkowego potwierdzenia w powyższej tabeli przedstawiono allele referencyjnego DNA nabytego od instytucji Coriell Cell Repositories (CCR) oraz 3 referencyjnych DNA nabytych od CCR i ATCC, zgodnych ze wzorcem opisanym przez Szibora i współpracowników (3).

---

## Czujnik jakości

Zestaw Investigator ESSplex SE QS Kit zawiera 2 wewnętrzne kontrole PCR (czujnik jakości QS1 i QS2) zapewniające przydatne informacje dotyczące ogólnej wydajności amplifikacji podczas reakcji PCR oraz występowania inhibitorów reakcji PCR. Wewnętrzne czujniki jakości zawarto w mieszaninie starterów. Ulegają one amplifikacji jednocześnie z polimorficznymi markerami STR. Czujniki jakości wyznakowane FAM pojawiają się we fragmentach w rozmiarze 71 pz (Quality Sensor 1, QS1) i 435 pz (Quality Sensor 2, QS2).

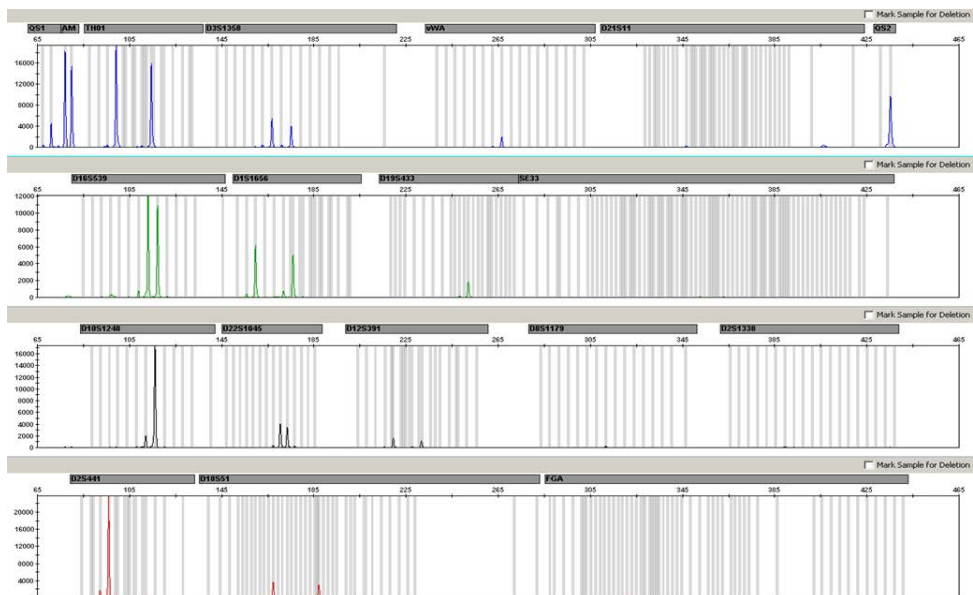
Aby rozwiązać problem podobieństwa sekwencji oraz możliwości nieswoistego wiązania, z użyciem algorytmu losowego zaprojektowano syntetyczną matrycę DNA kontroli wewnętrznej. Sekwencja matrycy różni się od wszystkich znanych sekwencji DNA i w szczególności nie wykazuje jakiegokolwiek podobieństwa do ludzkiego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

Zasadniczo pomyślna amplifikacja małego czujnika jakości (Quality Sensor 1, QS1) wskazuje, że prawidłowo przygotowano i przeprowadzono reakcję PCR, niezależnie od tego, czy w próbce obecne było DNA. Jeżeli podczas analizy produktów amplifikacji nie zostanie wykryty żaden czujnik jakości, oznacza to, że nieprawidłowo przeprowadzono pipetowanie składników do reakcji PCR lub nieprawidłowo przeprowadzono samą reakcję PCR. Wskazuje to, że użytkownik powinien powtórzyć eksperyment z zachowaniem większej ostrożności podczas etapu przygotowywania, aby móc uzyskać prawidłowe wyniki.

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

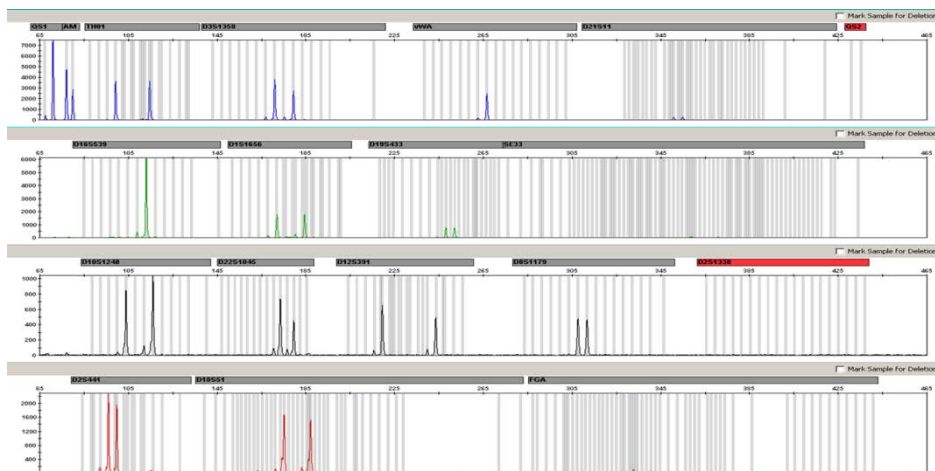
Ponadto analiza dwóch fragmentów kontroli wewnętrznej, czujników QS1 i QS2, oraz docelowych produktów amplifikacji markerów STR umożliwia wykrycie i rozróżnienie obecności inhibitorów lub degradacji DNA w reakcji amplifikacji.

W przypadku degradacji próbki amplifikacja mniejszych fragmentów docelowych jest wydajniejsza od amplifikacji większych fragmentów docelowych. Degradacja matrycy docelowej nie zagraża jednak amplifikacji fragmentów kontroli wewnętrznej z matrycy kontroli wewnętrznej (Ryc. 6). W związku z tym równa proporcja czujników QS1 i QS2 razem z proporcją przesuniętą na rzecz małych docelowych produktów STR sugeruje występowanie degradacji próbki.



**Ryc. 6. Elektroforegram analizy markerów STR w obecności DNA po degradacji (fragmenty po 150 pz).** Genomowy DNA pocięto ultradźwiękami na fragmenty po 150 pz. Długie fragmenty markerów STR amplifikowano z bardzo niskim wynikiem reakcji PCR, lecz fragmenty QS1 i QS2 amplifikowano normalnie z równymi wysokościami pików. U góry elektroforegramu przedstawiono markery. Czujniki jakości wyznakowane FAM (panel 1) pojawiają się w fragmentach w rozmiarze 71 pz (Quality Sensor 1, QS1) i 435 pz (Quality Sensor 2, QS2).

Jeżeli w próbce występują inhibitory, takie jak hematyna i kwas humusowy, amplifikacja jest mniej wydajna i dłuższe fragmenty DNA podlegają amplifikacji w mniejszym stopniu od krótszych fragmentów. Jeżeli analiza produktów amplifikacji wskazuje na niską wydajność amplifikacji dłuższych sekwencji docelowych markerów STR oraz dłuższego fragmentu czujnika jakości (Quality Sensor 2, QS2), lecz amplifikacja krótszego czujnika jakości (Quality Sensor 1, QS1) odbywa się pomyślnie, prawdopodobnie próbka uległa zanieczyszczeniu inhibitorami. Oznacza to, że przesunięcie proporcji na rzecz małego czujnika jakości (Quality Sensor 1, QS1) sugeruje obecność inhibitorów (Ryc. 7).



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

Analiza obecności dwóch czujników jakości pozwala użytkownikowi na identyfikację i różnicowanie obecności inhibitorów reakcji PCR lub występowania degradacji w obrębie próbki kryminalistycznej. Zapewnia to użytkownikowi przydatne informacje pozwalające interpretować dane oraz planować następne czynności. W Tabeli 39 przedstawiono zestawienie możliwych wyglądków profili oraz ich znaczenie.



**Tabela 39. Wyglądy profili oraz ich znaczenie**

Piki alleli	QS1	QS2	Interpretacja
Obecne	Obecne	Obecne	Profil prawidłowy
Brak	Obecne	Obecne	Brak DNA
Brak	Brak	Brak	Niepowodzenie reakcji PCR
Profil stoku górskiego	Obecne	Spadek	Obecność inhibitorów
Profil stoku górskiego	Obecne	Obecne	DNA po degradacji

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

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

## Allele

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

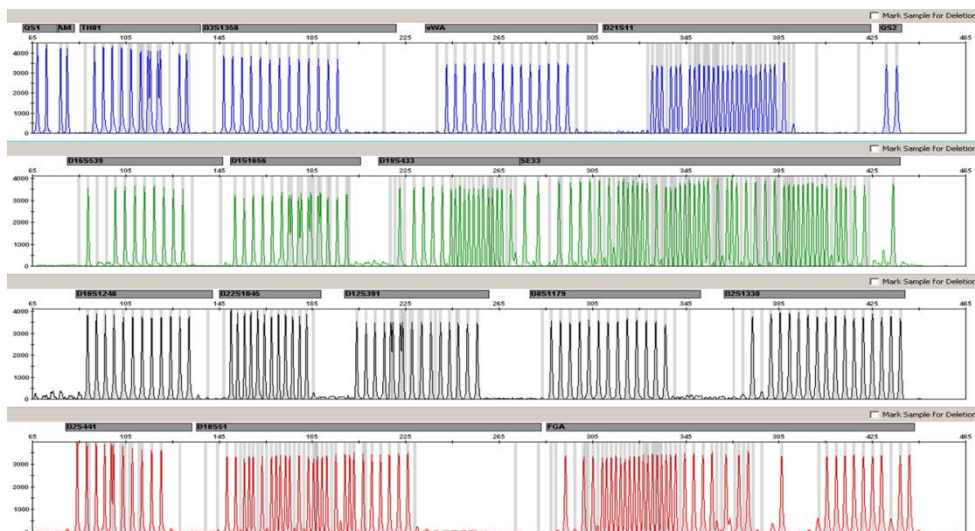
## Skalowanie

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

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

Locus	Znacznik barwnika	Numery powtórzeń drabiny alleli
QS1	6-FAM	S, Q
Amelogenina	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,3, 10, 10,3, 11, 13, 13,3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	6-FAM	24, 24,2, 25, 26, 26,2, 27, 28, 28,2, 29, 29,2, 30, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 35,2, 36, 36,2, 37, 38
QS2	6-FAM	Q, S
D16S539	BTG	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D1S1656	BTG	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,3, 15, 15,3, 16, 16,3, 17, 17,3, 18, 18,3, 19,3, 20,3
D19S433	BTG	6,2, 8, 9, 10, 11, 12, 12,2, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 16,2, 17, 17,2, 18,2
SE33	BTG	3, 4,2, 6,3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23,2, 24,2, 25, 25,2, 26,2, 27,2, 28,2, 29,2, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 36, 36,2, 37, 38, 39, 42
D10S1248	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D12S391	BTY	14, 15, 16, 17, 17,3, 18, 18,3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR	8, 9, 10, 11, 11,3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR	8, 9, 10, 10,2, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 16, 17, 17,2, 18, 18,2, 19, 20, 21, 21,2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
FGA	BTR	14, 16, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23, 23,2, 24, 24,2, 25, 25,2, 26, 27, 28, 29, 30, 31,2, 33, 34, 37,2, 42,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2, 47,2, 48,2, 50,2, 51,2

**Uwaga:** Dla lepszej orientacji wyróżniono allele w obrębie drabiny alleli.



**Ryc. 8. Elektroforegram drabiny alleli ESSplex SE QS analizowanej przy użyciu analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. Drabina alleli zawiera dwa allele dla każdego czujnika jakości (QS1 i QS2). Umożliwia to automatyczne oznaczanie pików czujników QS w toku analizy próbek.**

# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi (informacje kontaktowe można znaleźć na stronie [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com)).

## Komentarze i wskazówki

---

### Niezerównoważone profile, niskie natężenie sygnałów

- |   |  |
|---|--|
| a) Nieprawidłowa objętość mieszaniny do szybkiej reakcji lub mieszaniny starterów | Sprawdzić przygotowanie reakcji i powtórzyć amplifikację.        |
| b) Przed rozdzieleniem mieszaniny Master Mix nie wykonano jej wytrząsania         | Dokładnie wytrząsać mieszaninę Master Mix i krótko ją odwirować. |

### Spadek wysokości pików czujnika QS1 i/lub QS2 w eksperymentach z zastosowaniem wzorców

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

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

### Przygotowanie próbki

Konieczne jest zwiększenie natężenia sygnału próbki.

Zmniejszyć objętość wzorca DNA Size Standard 550 (BTO) do wysokości pików na poziomie około 500 RFU.

Oczyścić produkty reakcji PCR przed rozpoczęciem analizy. Zaleca się używanie zestawu MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN, numery kat. 28004 i 28006), który gwarantuje szybkie i skuteczne oczyszczanie.

## Komentarze i wskazówki

### Nieodpowiednia macierz/kalibracja widmowa

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

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

### Wiele pików jest oznaczanych w próbkach jako allele spoza drabiny (Off-Ladder, OL)

- a) Wzorec DNA Size Standard 550 (BTO) nie został poprawnie zdefiniowany lub zidentyfikowany. Kliknąć pomarańczową ikonę „Size Match Editor” (Edytor dopasowania wielkości) na górnym pasku narzędzi oprogramowania GeneMapper *ID* lub GeneMapper *ID-X*. Oznaczyć pomarańczowe fragmenty we wszystkich próbkach. Do zestawów Investigator Human Identification PCR Kit należy zawsze stosować wzorec DNA Size Standard 550.
- b) Za wysokie natężenia sygnału. Jeżeli wysokości pików próbek wykraczają poza liniowy zakres wykrywania (>5000 RFU/>20 000 RFU)\*, może dojść do zwiększenia częstotliwości występowania pików satelitarnych, podzielonych pików i artefaktów. Zredukować etapami czas iniekcji do minimum 1 sekundy, zredukować objętość produktu amplifikacji PCR do analizy lub zredukować ilość DNA do reakcji PCR.
- c) Pęcherzyki w kapilarze powodują powstawanie przenikania pików w obrębie wszystkich paneli kolorystycznych („skoki”), które skutkują niewłaściwym określeniem alleli. Powtórzyć elektroforezę w celu potwierdzenia wyników. Sprawdzić maksymalną liczbę iniekcji zalecaną przez producenta aparatu. W razie potrzeby przygotować nową matrycę kapilarną.
- d) Różnice w wydajności cyklu pomiędzy kapilarami analizatora wielokapilarnego mogą skutkować przesunięciem przypisywania alleli. Aby zapewnić wiarygodne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin alleli.
- e) Niska temperatura w pomieszczeniu albo niska temperatura bufora CE może skutkować przesunięciami migracyjnymi fragmentów lub pikami OL. Należy dopilnować utrzymywania warunków otoczenia zgodnych z zaleceniami producenta aparatu. Należy upewnić się, że bufony osiągnęły temperaturę otoczenia. Producent aparatu zaleca wstępne rozgrzanie aparatu CE (przez ~30 minut).

## Komentarze i wskazówki

### Niewłaściwa iniekcja/plik drabiny alleli

- a) Z powodu zaburzeń podczas elektroforezy dodatkowy sygnał może zostać zidentyfikowany jako pik drabiny alleli. W razie niewłaściwego przypisania pików drabiny alleli nie można jej używać do analizy. Należy użyć innej iniekcji/innego pliku drabiny alleli i sprawdzić dane analizowanych wielkości przy użyciu wzorca wielkości (w pz) drabiny alleli. Do zestawów Investigator Human Identification PCR Kit należy zawsze stosować wzorzec DNA Size Standard 550.
- b) Jeden z pików drabiny alleli ma intensywność poniżej wartości wykrywania pików (50–200 RFU) użytej metody analitycznej i w związku z tym nie został zidentyfikowany. Drabinę alleli należy załadować do analizatora w stężeniu wyższym od analizowanych próbek. Alternatywnie można analizować dane drabiny alleli, wybierając w oprogramowaniu analitycznym niższą wartość wykrywania pików.
- c) Nie zidentyfikowano jednego pików drabiny alleli, ponieważ wykracza on poza oczekiwany zakres wielkości zdefiniowany w oprogramowaniu (w pz). Porównać długość fragmentów (w pz) pierwszego allelu drabiny alleli w jednym kolorze z odpowiadającą wartością kategorii. Następnie porównać ją z wartością pozostałych alleli.
- d) Nie znaleziono alleli punktowych. Allele punktowe to allele różniące się o przynajmniej 1 pz od następnego allela całkowitego. Sprawdzić ustawienia metody analitycznej. Zmniejszyć wartość parametru Peak Window Size (Rozmiar okna pików) do 11 punktów.
- e) Różnice w wydajności cyklu pomiędzy kapilarami analizatora wielokapilarnego mogą skutkować przesunięciem przypisywania alleli. Aby zapewnić wiarygodne przypisywanie alleli w analizatorach wielokapilarnych, należy oznaczyć kilka drabin alleli.
- \* >5000 RFU dla analizatora 3100 i 3130 Genetic Analyzer; >20 000 RFU dla analizatora Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

---

# Literatura

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. *Int. J. Legal Med.* 110, 175–176.
2. Hill, C.R., Kline, M.C., Coble, M.D., and Butler, J.M. (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.*, 53, 73–80.
3. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138, 37–43.

# Załącznik: Interpretacja wyników

Wykorzystanie odpowiedniego oprogramowania analitycznego do analizy i automatycznego przypisania alleli po reakcji PCR stanowi gwarancję precyzyjnego i wiarygodnego oznaczania alleli.

## Ogólna procedura analizy

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

## Przenikania pików

Przenikanie pików może występować, jeżeli wysokości pików wykraczają poza liniowy zakres wykrywania (patrz „Rozwiązywanie problemów”, strona 60) lub jeżeli zastosowano niewłaściwą macierz. Przenikające się piki występują w pozycjach odpowiadających im pików w innych kanałach kolorów, na ogół z niższym natężeniem sygnału. Aby zapobiec występowaniu przenikania, wysokość pików nie powinna przekraczać wartości progowych.

## Piki satelitarne

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



---

## Dodanie nukleotydów niezależne od matrycy

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

## Artefakty

Temperatura w pomieszczeniu może wpływać na skuteczność oznaczenia produktów reakcji PCR w aparatach wielokapilarnych, powodując występowanie pików podrzędnych lub podzielonych. W razie wystąpienia pików podrzędnych lub podzielonych zaleca się ponownie przeprowadzić iniekcję próbki.

# Informacje dotyczące zamawiania

<b>Produkt</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
Investigator ESSplex SE QS Kit (100)	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 2.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	381575
Investigator ESSplex SE QS Kit (400)	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 2.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	381577
<b>Powiązany produkt</b>		
Matrix Standard BT5 multi cap. (50)	Wzorzec matrycy 6-FAM, BTG, BTY, BTR i BTO	386125
<b>Zestawy Investigator Human Identification PCR Kit</b>		
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 2.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 24plex (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	382415
Investigator 24plex GO! Kit (200)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 2.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 24plex (BTO)	382426

<b>Produkt</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
Investigator 26plex QS Kit (100)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 3.0, kontrolny DNA, drabina alleli oraz woda wolna od nukleaz	382615
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	381625
Investigator IDplex GO! Kit (200)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji, kontrolny DNA, drabina alleli oraz wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO)	381636
Investigator HDplex Kit (100)	Mieszanina starterów, mieszanina reakcyjna, polimeraza DNA, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	381215
Investigator Triplex AFS QS Kit (400)	Mieszanina starterów, mieszanina reakcyjna, polimeraza DNA, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (ROX) oraz woda wolna od nukleaz	380317
Investigator Argus X-12 QS Kit (25)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 2.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	383223

<b>Produkt</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
Investigator Argus Y-28 QS Kit (100)*	Mieszanina starterów, mieszanina do szybkiej reakcji 3.0, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	383625
Investigator DIPplex Kit (100)	Mieszanina starterów, mieszanina reakcyjna, polimeraza DNA, kontrolny DNA, drabina alleli, wzorzec DNA Size Standard 550 (BTO) oraz woda wolna od nukleaz	384015
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Do użytku w systemach Applied Biosystems 7500 Real-Time System: Quantiplex Pro Reaction Mix, Quantiplex Pro Primer Mix, Quantiplex Pro Control DNA M1 i QuantiTect® Nucleic Acid Dilution Buffer	387216
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Do użytku w systemach QIAGEN RotorGene Q Real-Time System: Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix, Quantiplex Pro RGQ Primer Mix, Male Control DNA M1 i QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316

Aktualne informacje licencyjne oraz informacje na temat wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

\* Dostępne są większe zestawy, prosimy o przesyłanie zapytań.

# Historia zmian dokumentu

<b>Data</b>	<b>Zmiany</b>
06/2015	Wstępne wydanie
12/2020	Dodano opcjonalne wydłużanie końcowe. Dodano oświadczenie dotyczące spełniania wymagań normy ISO 18385 przez zestawy Investigator ESS SE QS Kit. Zaktualizowano części Informacje dotyczące zamawiania.
02/2021	Tabela 3 została podzielona na Tabele 3a i 3b. Zaktualizowano część Informacje dotyczące zamawiania. W części Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika dodano odniesienia do urządzeń „Veriti™ 96-Well Thermal Cycler” i „ProFlex™ 96-well PCR System”.

---

## Uwagi

#### Umowa ograniczonej licencji dla zestawu Investigator ESSplex SE QS Kit

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

1. Niniejszy produkt może być używany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania składników zawartych w niniejszym zestawie ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie naruszają praw stron trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN podkreśla, że nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązują się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może egzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamplifier®, HotStarTaq®, Investigator®, Making improvements in life possible®, MinElute®, QuantiTect® (QIAGEN Group); Biometra™ (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avant™, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Hi-Di™, POP-4®, ProFlex™, Veriti™ (Thermo Fisher Scientific lub podmioty zależne), GenBank® (Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych (US Department of Health and Human Services)). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

02/2021 HB-1963-003 © 2021 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

Składanie zamówień [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Pomoc techniczna [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Strona WWW [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)