
Février 2021

Manuel du Investigator[®] 24plex GO!

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

Contenu

Contenu du kit.....	4
Transport et conservation	5
Utilisation prévue	5
Informations de sécurité	6
Contrôle de la qualité.....	6
Introduction	7
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur	10
Remarques importantes.....	11
Protocole : amplification par PCR à partir de sang sur applicateur FTA et autre papier	12
Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur applicateur FTA et autre papier	15
Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur Bode Buccal DNA Collectors	18
Protocole : amplification par PCR à partir de lysats sur écouvillons buccaux	21
Protocole : électrophorèse à l'aide du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer.....	24
Étalonnage spectral et génération de matrice.....	25
Préparation des échantillons	32
Configuration d'un cycle	33
Démarrage du cycle	37
Paramètres et méthode d'analyse	38
Protocole : analyse	39
Logiciel d'analyse.....	39

Contrôles.....	40
Capteur de qualité.....	42
Allèles.....	46
Guide de résolution des problèmes.....	49
Références.....	53
Annexe A : interprétation des résultats.....	54
Annexe B : changement des volumes de PCR avec le Investigator 24plex GO! Kit.....	56
Pour commander.....	57
Historique des révisions du document.....	59

Contenu du kit

Investigator 24plex GO! Kit	(200)	(1000)
N° de référence	382426	382428
Nombre de réactions	200	1 000
Fast Reaction Mix 2.0*	2 x 750 µl	10 x 750 µl
Primer Mix 24plex GO!	2 x 1 250 µl	10 x 1 250 µl
Control DNA 9948 (5 ng/µl)	50 µl	50 µl
DNA Size Standard 24plex (BTO)	110 µl	5 x 110 µl
Allelic ladder 24plex (Échelle allélique 24plex)	2 x 25 µl	6 x 25 µl
Protocole de démarrage rapide	1	1

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

Transport et conservation

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

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

Utilisation prévue

Le Investigator 24plex GO! Kit est prévu pour des applications de biologie moléculaire, dans le cadre d'analyses médico-légales, de recherche d'identité et de recherche de paternité. Ce produit n'est pas destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement d'une maladie.

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

Informations de sécurité

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

Contrôle de la qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO de QIAGEN, chaque lot du Investigator 24plex GO! Kit a été testé par rapport aux spécifications prédéterminées afin d'assurer une qualité constante du produit. Les Investigator 24plex GO! Kits répondent aux exigences de la norme ISO 18385.

Introduction

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

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

Le Investigator 24plex GO! Kit est conçu spécifiquement pour l'amplification directe rapide à partir de cellules sanguines ou buccales sur des applicateurs FTA® et autres types de papiers et sur des écouvillons buccaux. Le kit utilise la technologie de PCR à cycle court de QIAGEN qui permet de réaliser une amplification en 45 minutes environ. Les prélèvements sur les applicateurs FTA et d'autres papiers filtres peuvent être utilisés sans prétraitement. Pour les écouvillons buccaux, un protocole de lyse rapide et adapté génère un lysat brut pour l'amplification en 5 minutes environ. Les amorces sont rendues fluorescentes à l'aide des colorants suivants :

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

La quantité d'échantillon recommandée est un prélèvement de 1,2 mm de diamètre pour les applicateurs FTA et autres papiers filtres ou 2 µl de lysat sur les écouvillons buccaux.

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

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

Pour en savoir plus sur les microvariants non inclus dans l'échelle allélique du Investigator 24plex, consulter le site Internet de l'institut national des normes et technologies (National Institute of Standards and Technology, NIST) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

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

Locus	Numéro d'enregistrement GenBank®	Motif répété de l'allèle de référence	Carte chromosomique
Amélogénine X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amélogénine Y	M55419	–	Yp11.2
DYS391	AC011302	[TCTA] ₁₁	Yq11.21
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] ₁₆ [TGA][TAGA][TAGG] ₁ [TG] ₅	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] ₁₂	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	3p25.3
D5S818	G08446	[AGAT] ₁₁	5q23.2
D7S820	G08616	[GATA] ₁₂	7q21.11
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] ₁₃	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	12p13.2
D13S317	G09017	[TATC] ₁₃	13q31.1
D16S539	G07925	[GATA] ₁₁	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] ₁₁	19q12

Suite du tableau sur la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Locus	Numéro d'enregistrement GenBank	Motif répété de l'allèle de référence	Carte chromosomique
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	22q12.3
CSF1PO	X14720	[AGAT] ₁₂	5q33.1
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
TPOX	M68651	[AATG] ₁₁	2p25.3
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

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

Tous les protocoles

- Hi-Di™ Formamide, 25 ml (Applied Biosystems, N° de réf. 4311320)
- Matrix Standards BT6 pour séquenceurs multicapillaires, p. ex. 3500 Genetic Analyzers
- Pipettes et embouts de pipettes
- L'un des séquenceurs d'ADN suivants :*
 - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- L'un des thermocycleurs de PCR suivants :*
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
 - ProFlex™ 96-well PCR System
 - QIAamplifier® 96
 - Bio-Rad® PTC-200
 - Biometra UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Tubes ou plaques de PCR
- Microcentrifugeuse pour tubes ou plaques de PCR

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

- UniCore Punch Kit 1,2 mm (N° de réf. WB100028)

* Cette liste de fournisseurs n'est pas exhaustive et ne mentionne pas de nombreux fournisseurs de fournitures biologiques figurant parmi les plus importants.

Pour les protocoles basés sur les cellules buccales sur papier

- Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) ou (200) (QIAGEN, N° de réf. 386528 ou 386526)

Pour le protocole basé sur les cellules buccales sur Bode Buccal DNA Collectors™

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, N° de réf. 386516)

Pour les protocoles basés sur les lysats sur écouvillons buccaux

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, N° de réf. 386516)
- Tubes de microcentrifugation de 2 ml
- Agitateur pour tubes de microcentrifugation de 2 ml

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

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

Remarques importantes

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

Protocole : amplification par PCR à partir de sang sur applicateur FTA et autre papier

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR issus de prélèvements de sang sur des applicateurs FTA et autres papiers avec le kit Investigator 24plex GO! Kit.

Remarques importantes avant de commencer

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

Étapes préliminaires

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

Procédure

1. Faites un prélèvement de 1,2 mm au centre de la tache de sang avec un appareil adapté (p. ex. UniCore Punch Kit 1,2 mm, N° de réf. WB100028).

Important : ne faites pas plus d'un prélèvement à la fois.

2. Préparer un mélange principal tel que décrit dans le Tableau 2, page 13.

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparez le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif. Le mélange principal contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).

3. Vortexer complètement le mélange principal et en distribuer 20 µl (ou 23 µl, si l'Investigator STR GO! Punch Buffer, N° de réf. 386526 ou 386528 en option est utilisé) dans les tubes PCR ou les puits d'une plaque PCR.

4. Transférez un disque de 1,2 mm à chaque réaction.

Remarque : ne mélangez pas la réaction après le transfert du disque.

5. Préparer les contrôles positif et négatif.

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

Remarque : vous pouvez adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein de votre laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. N'ajoutez pas de disque vierge au puits de contrôle positif.

Contrôle négatif : n'ajoutez aucun ADN matriciel. N'ajoutez pas de disque vierge ou d'eau dans le tube de PCR ou le puits de contrôle négatif.

6. Centrifugez brièvement les réactions afin que les disques soient entièrement immergés.

7. Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en appliquant les conditions figurant dans le Tableau 3, page 14.

Remarque : pour le thermocycleur GeneAmp 9700 avec le bloc aluminium, utilisez le paramètre « Std Mode » (Mode standard) et pour le thermocycleur avec le bloc argent ou argent plaqué or, utilisez le paramètre « Max Mode » (Mode maximal). Ne pas utiliser la fonction « 9600 Emulation Mode » (Mode d'émulation 9600).

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

Tableau 2. Configuration du mélange principal

Composant	Volume par réaction
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 µl
Mélange d'amorces	12,5 µl
Volume total	20,0 µl

Remarque : si du sang sur des applicateurs FTA a été conservé pendant un temps prolongé, nous recommandons d'utiliser l'Investigator STR GO! Punch Buffer pour corriger l'éventuelle inhibition. Ajouter 3 µl d'Investigator STR GO! Punch Buffer par réaction.

Tableau 3a. Protocole de cycle standard pour le sang sur applicateur FTA et autre papier

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur applicateur FTA et autre papier

Ce protocole concerne l'amplification par PCR directe de locus STR issus de prélèvements de cellules buccales sur des applicateurs FTA et autres papiers avec le Investigator 24plex GO! Kit. (Pour les Bode Buccal DNA Collectors, consultez la section Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur Bode Buccal DNA Collectors, page 18.)

Remarques importantes avant de commencer

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

Étapes préliminaires

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

Procédure

1. Effectuer un prélèvement de 1,2 mm avec un outil approprié (p. ex. UniCore Punch Kit 1,2 mm, N° de réf. WB100028).

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

Important : ne faites pas plus d'un prélèvement à la fois.

2. Préparer un mélange principal tel que décrit dans le Tableau 4, page 17.
En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparez le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif. Le mélange principal contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).
3. Vortexez soigneusement et distribuez 22 µl dans des tubes de PCR ou dans les puits d'une plaque de PCR.
4. Transférez un disque de 1,2 mm à chaque réaction.
Remarque : ne mélangez pas la réaction après le transfert du disque.
5. Préparer les contrôles positif et négatif.
Contrôle positif : utilisez 1 µl d'ADN de contrôle (c.-à-d. 5 ng).
Remarque : vous pouvez adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein de votre laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. N'ajoutez pas de disque vierge au puits de contrôle positif.
Contrôle négatif : n'ajoutez aucun ADN matriciel. N'ajoutez pas de disque vierge ou d'eau dans le tube de PCR ou le puits de contrôle négatif.
6. Centrifugez brièvement les réactions afin que les disques soient entièrement immergés.
7. Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en appliquant les conditions figurant dans le Tableau 5, page 17.
Remarque : pour le thermocycleur GeneAmp 9700 avec le bloc aluminium, utilisez le paramètre « Std Mode » (Mode standard) ; pour le thermocycleur avec le bloc argent ou argent plaqué or, utilisez le paramètre « Max Mode » (Mode maximal). Ne pas utiliser la fonction « 9600 Emulation Mode » (Mode d'émulation 9600).
8. Une fois le protocole de cycle terminé, stocker les échantillons entre -30 °C et -15 °C à l'abri de la lumière ou passer directement à l'électrophorèse.

Tableau 4. Configuration du mélange principal

Composant	Volume par réaction
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 µl
Mélange d'amorces	12,5 µl
Investigator STR GO! Punch Buffer	2,0 µl
Volume total	22,0 µl

Tableau 5a. Protocole de cycle standard pour les cellules buccales sur applicateur FTA et autre papier

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 5b. Protocole de cycle en option pour les cellules buccales sur applicateur FTA et autre papier

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

Protocole : amplification par PCR à partir de cellules buccales sur Bode Buccal DNA Collectors

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

Remarques importantes avant de commencer

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

Étapes préliminaires

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

Procédure

1. Faites un prélèvement de 1,2 mm à l'extrémité (arrondie) du Bode Buccal DNA Collector avec un instrument adapté (p. ex. UniCore Punch Kit 1,2 mm, N° de réf. WB100028) dans une plaque de PCR de 0,2 ml ou dans un tube de PCR de 0,2 ml.

Important : ne mettez pas plus d'un prélèvement à la fois dans un puits ou un tube.

2. Ajoutez 2 µl du tampon de lyse du Investigator STR GO! Kit directement sur le prélèvement de 1,2 mm. Centrifugez brièvement si nécessaire pour pouvoir rassembler le prélèvement et le tampon au fond de la plaque ou du tube.
3. Incubez l'échantillon à 95 °C pendant 5 minutes. Ne fermez pas la plaque.

Remarque : le tampon de lyse va s'évaporer.

4. Préparer un mélange principal tel que décrit dans le Tableau 6, page 19. Vortexez bien la réaction.

En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparez le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif. Le mélange principal contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).

5. Après l'incubation, distribuez 20 µl du mélange principal dans chaque puits de la plaque de PCR ou dans les tubes de PCR contenant le prélèvement de 1,2 mm.

Remarque : ne mélangez pas la réaction après avoir distribué le mélange principal.

6. Préparer les contrôles positif et négatif.

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

Remarque : vous pouvez adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein de votre laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. N'ajoutez pas de disque vierge au puits de contrôle positif.

Contrôle négatif : n'ajoutez aucun ADN matriciel. N'ajoutez pas de disque vierge ou d'eau dans le tube de PCR ou le puits de contrôle négatif.

7. Centrifugez brièvement les réactions afin que les disques soient entièrement immergés.

8. Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en appliquant les conditions figurant dans le Tableau 7, page 20.

Remarque : pour le GeneAmp PCR System 9700 avec le module bloc aluminium, utilisez le paramètre « Std Mode » (Mode standard). Pour le module bloc argent ou argent plaqué or, utilisez le paramètre « Max Mode » (Mode maximal). Ne pas utiliser la fonction « 9600 Emulation Mode » (Mode d'émulation 9600).

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

Tableau 6. Configuration du mélange principal

Composant	Volume par réaction
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 µl
Mélange d'amorces	12,5 µl
Volume total	20,0 µl

Tableau 7a. Protocole de cycle standard pour les Bode Buccal DNA Collectors

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

Tableau 7b. Protocole de cycle en option pour les Bode Buccal DNA Collectors

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

Protocole : amplification par PCR à partir de lysats sur écouvillons buccaux

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

Remarques importantes avant de commencer

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

Étapes préliminaires

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

Procédure

1. Placez l'écouvillon dans un tube de microcentrifugation de 2 ml.

Coupez, cassez ou désolidarisez délicatement l'extrémité de l'écouvillon.

Remarque : préparez un écouvillon vierge comme contrôle négatif.

2. Ajoutez 500 µl de STR GO! Lysis Buffer à l'échantillon.
3. Incubez à 95 °C pendant 5 minutes en agitant à 1 200 tr/min dans un agitateur thermique.

Facultatif : incubez à température ambiante pendant 5 minutes en agitant à 1 200 tr/min dans un agitateur thermique.

4. Préparer un mélange principal tel que décrit dans le Tableau 8, page 22.
En raison de perte possible de réactif pendant les transferts, préparez le mélange en y ajoutant des réactions supplémentaires. Ajouter également des réactions avec les contrôles positif et négatif. Le mélange principal contient tous les composants nécessaires pour la PCR excepté l'ADN matriciel (échantillon).
5. Vortexez soigneusement et distribuez 20 µl dans des tubes de PCR ou dans les puits d'une plaque de PCR.
6. Mélangez bien le lysat de l'écouvillon puis transférez-en 2 µl directement dans chaque réaction.
7. Préparer les contrôles positif et négatif.
Contrôle positif : utilisez 1 µl d'ADN de contrôle (c.-à-d. 5 ng).
Remarque : vous pouvez adapter la quantité d'ADN de contrôle après avoir défini le nombre optimal de cycles de PCR au sein de votre laboratoire si les signaux sont trop faibles ou trop élevés. N'ajoutez pas de disque vierge au puits de contrôle positif.
Contrôle négatif : utilisez un lysat d'écouvillon vierge.
8. Programmez le thermocycleur conformément aux instructions du fabricant en appliquant les conditions figurant dans le Tableau 9, page 23.
Remarque : pour le thermocycleur GeneAmp 9700 avec le bloc aluminium, utilisez le paramètre « Std Mode » (Mode standard) ; pour le thermocycleur avec le bloc argent ou argent plaqué or, utilisez le paramètre « Max Mode » (Mode maximal). Ne pas utiliser la fonction « 9600 Emulation Mode » (Mode d'émulation 9600).
9. Une fois le protocole de cycle terminé, stocker les échantillons entre -30 °C et -15 °C à l'abri de la lumière ou passer directement à l'électrophorèse.

Tableau 8. Configuration du mélange principal

Composant	Volume par réaction
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 µl
Mélange d'amorces	12,5 µl
Volume total	20,0 µl

Tableau 9a. Protocole de cycle standard pour les lysats sur écouvillons buccaux

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

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

* Hot start pour activer l'ADN polymérase.

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

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

Le Investigator 24plex GO! Kit est validé pour une utilisation sur le 3500/3500xL Genetic Analyzer qui requiert le logiciel 3500 Data Collection Software v1 ou v2 ou le logiciel HID Updater 3500 Data Collection v2.0.

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

Pour des instructions détaillées sur la configuration de l'appareil, l'étalonnage spectral ou l'application du logiciel Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software v1 ou v2 et du logiciel GeneMapper ID-X Software v1.2, consultez le Guide d'utilisation du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide*). Le séquenceur doté de 8 capillaires est le modèle Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer et le séquenceur doté de 24 capillaires est le modèle Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

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

Le matériel requis pour l'électrophorèse est indiqué dans le Tableau 10.

Tableau 10. Matériel requis pour l'électrophorèse

Composant	Volume par réaction
Capillaire	Jeu de 36 cm pour le séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polymère	POP-4™ pour le séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Tampon	Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

Étalonnage spectral et génération de matrice

Avant d'évaluer la taille des fragments d'ADN, réalisez un étalonnage spectral avec les 6 marqueurs fluorescents 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP et BTO pour chaque séquenceur (Tableau 11, page 26).

La procédure d'étalonnage génère une matrice utilisée pour corriger le chevauchement des spectres d'émission de fluorescence des colorants.

Important : un étalonnage spectral doit être réalisé pour chaque nouveau jeu de capillaires. Il comprend les étapes suivantes :

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

Préparation de l'appareil

Avant de procéder à l'étalonnage spectral, vérifiez que l'étalonnage spatial a été réalisé. Ce processus est décrit en détail dans le *Guide d'utilisation du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide).

Tableau 11. Les 6 marqueurs fluorescents de BT6

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

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

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

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

Composant	Volume
Hi-Di Formamide	90 µl
Matrix Standard BT6 pour plusieurs capillaires	10 µl

3. Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
4. Charger 10 µl de mélange dans chacun des 8 puits d'une plaque de 96 puits, par exemple dans les positions A1-H1.
5. Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.
6. Congeler ultrarapidement en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min. Le thermocycleur réglé à 4 °C peut également servir à refroidir la plaque.

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

1. Avant d'ouvrir les tubes, les passer au vortex puis les centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.
2. Préparez un mélange de formamide et de Matrix Standard BT6 comme indiqué dans le Tableau 13.

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

Composant	Volume
Hi-Di Formamide	225 µl
Matrix Standard BT6 pour plusieurs capillaires	25 µl

3. Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
4. Charger 10 µl de mélange dans chacun des 24 puits d'une plaque de 96 puits, aux positions A1–H1, A2–H2 et A3–H3.
5. Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.
6. Congeler ultrarapidement en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min.
Le thermocycleur réglé à 4 °C peut également servir à refroidir la plaque.

Montage de la plaque et chargement sur l'appareil

Les étapes à suivre sont décrites en détail dans le *Guide d'utilisation du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide).

Configuration du logiciel de l'ensemble de colorants BT6

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

1. Pour créer un nouvel ensemble de colorants, sélectionnez « Library » (Bibliothèque). Sous « Analyze » (Analyser), accéder à « Dye Sets » (Ensembles de colorants) et cliquer sur « Create » (Créer).
2. Renseigner le champ « Dye Set Name » (Nom de l'ensemble de colorants), par exemple BT6.
3. Sous « Chemistry » (Chimie), sélectionner « Matrix Standard » (Matrice étalon) et en tant que « dye set template » (Modèle d'ensemble de colorants), sélectionner « AnyDye Template » (Matrice AnyDye).
4. Sous « Calibration Peak Order » (Ordre des pics d'étalonnage), organiser les couleurs comme suit : 6 – bleu, 5 – orange, 4 – vert, 3 – jaune, 2 – rouge et 1 – violet.

Remarque : il s'agit du réglage correct de l'appareil pour l'ordre des pics, même si l'ordre des pics du Matrix Standard BT6 est différent.

5. Modifier les « Parameters » (Paramètres) comme suit :
 - Matrix Condition Number Upper Limit (Limite supérieure du nombre de conditions de la matrice) : 13,5
 - Locate Start Point After Scan (Localiser le point de départ après analyse) : 1 000
 - Locate Start Point Before Scan (Localiser le point de départ avant analyse) : 5 000
 - Limit Scans To (Limiter les analyses à) : 2 750
 - Sensitivity (Sensibilité) : 0,4
 - Minimum Quality Score (Score de qualité minimum) : 0,95
6. Cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour confirmer les modifications.

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: BT6

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: AnyDye Template

Arrange Dyes

Dye Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reduced Selection	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calibration Peak Order	6	4	3	2	1	5

Parameters

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

Matrix Condition Number Upper Limit: 13.5

Locate Start Point: * After Scan: 1000, * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 2750

Sensitivity: 0.4

* Minimum Quality Score: 0.95

Notes

Close Save

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

Réalisation d'un cycle d'étalonnage spectral

L'étalonnage spectral peut commencer une fois que les plaques multipuits contenant le mélange d'étalonnage spectral sont placées sur le plateau du passeur automatique d'échantillons.

1. Pour accéder à l'écran Spectral Calibration (Étalonnage spectral), sélectionner « Maintenance » sur le tableau de bord du 3500 Series Data Collection Software.
2. Pour configurer un cycle d'étalonnage, aller à « Calibrate » (Calibrer), puis « Spectral » et sélectionner « Calibration Run » (Cycle d'étalonnage).
3. Le nombre de puits de la plaque d'étalonnage spectral et leur emplacement sur l'appareil doivent être spécifiés.
4. Sous « Chemistry Standard » (Étalon de chimie), sélectionnez « Matrix Standard » (Matrice étalon) et en tant que « Dye Set Name » (Nom d'ensemble de colorants), sélectionnez par exemple le BT6 créé précédemment (voir Configuration du logiciel de l'ensemble de colorants BT6, page 28).
5. Facultatif : activer « Allow Borrowing » (Autoriser l'emprunt).
6. Cliquer sur « Start Run » (Démarrer le cycle).

Vérification de la matrice

Cliquer sur un capillaire dans le tableau afin d'afficher les résultats correspondants pour chaque capillaire sous le tableau des résultats de cycle (capillaire, valeur de qualité et numéro de condition).

- La valeur de qualité (Q) de chaque capillaire doit être supérieure à 0,95 et le nombre de conditions (C) doit être compris entre 1 et 13,5.
- Vérifier que la ligne de base des échantillons de matrice est plane. Comme le montre la figure ci-dessous, il doit y avoir 6 pics avec des hauteurs de 1 000 à 6 000 RFU pour chaque échantillon de matrice (**Remarque** : la plage optimale est de 3 000 à 5 000 RFU.)

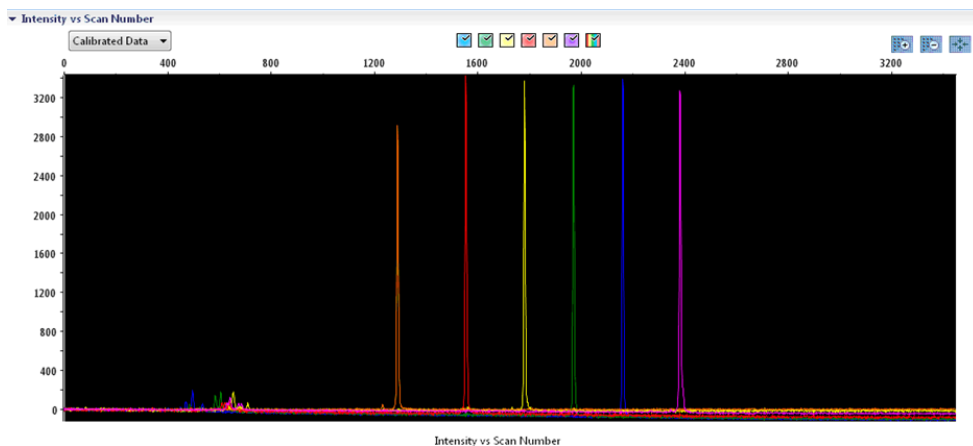


Figure 2. Électrophérogamme d'étalonnage spectral du Matrix Standard BT6 sur le séquenceur Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Une fois l'étalonnage spectral réussi, les résultats s'affichent en vert dans la rangée « Overall » (Résultats globaux). Si les résultats s'affichent en rouge, consultez la section Dépannage lors de l'étalonnage spectral du *Guide d'utilisation du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide).

▼ Capillary Run Data

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

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 Not Calibrated

Figure 3. Exemple d'étalonnage spectral réussi du Matrix Standard BT6 pour tous les capillaires du séquenceur Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

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

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

Si les données pour tous les capillaires satisfont les critères précités, cliquer sur « Accept » (Accepter). Si les données d'un capillaire quelconque ne satisfont pas aux critères ci-dessus, cliquer sur « Reject » (Rejeter) puis consulter la section Dépannage lors de l'étalonnage spectral du *Guide d'utilisation du séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide).

Préparation des échantillons

1. Avant d'ouvrir les tubes, les passer au vortex puis les centrifuger brièvement pour rassembler le contenu au fond des tubes.
2. Préparer un mélange de formamide et de taille standard d'ADN comme indiqué dans le Tableau 14.
3. Passer au vortex et centrifuger brièvement le mélange.
4. Pour chaque échantillon à analyser, transférer une aliquote de mélange de 12 μ l dans un tube.
5. Ajouter 1 μ l de produit de PCR ou d'échelle allélique (dilué, si nécessaire).
6. Dénaturer pendant 3 min à 95 °C.
7. Congeler ultrarapidement en plaçant la plaque sur de la glace pendant 3 min.
Le thermocycleur réglé à 4 °C peut également servir à refroidir la plaque.
8. Charger les échantillons sur le plateau.

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

Composant	Volume par échantillon
Hi-Di Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 24plex (BTO)	0,5 µl

Remarque : Dans la mesure où les injections ont lieu au même moment pour tous les capillaires, un minimum de 1 colonne entière (protocole à 8 échantillons) ou de 3 colonnes entières (protocole à 24 échantillons) doivent être pipetés dans la plaque des séquenceurs multicapillaires. Si le nombre d'échantillons analysés est inférieur, il est impératif de remplir les positions vides avec 12 µl Hi-Di Formamide.

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

- Appareils à 8 capillaires : une échelle allélique pour 3 injections
- Appareils à 24 capillaires : une échelle allélique pour chaque injection

Important : la température ambiante réelle peut affecter la performance des produits de PCR sur les séquenceurs multicapillaires, pouvant entraîner la formation d'épaulements ou de pics multiples, en particulier à des températures plus basses. **Veiller à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil.** Veiller également que les tampons sont équilibrés selon les conditions ambiantes.

Configuration d'un cycle

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

- Protocole de l'appareil
- Taille standard
- Protocole de CQ
- Dosage

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

Protocole de l'appareil

1. Pour configurer le protocole de l'appareil, sélectionnez « Library » (Bibliothèque) sous « Analyze » (Analyser). Accédez ensuite à « Instrument Protocols » (Protocoles de l'appareil) puis cliquez sur « Create » (Créer).

Remarque : Modifier les paramètres par défaut du Module de cycle de « HID36_POP4 » comme présenté dans le Tableau 15.

2. Les paramètres indiqués dans le Tableau 15 doivent être saisis ou sélectionnés.
3. Cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour confirmer les modifications.

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

Paramètre	Valeur pour le 3500	Valeur pour le 3500xL
Application Type (Type d'application)	HID	HID
Capillary Length (Longueur des capillaires)	36 cm	36 cm
Polymer (Polymère)	POP4	POP4
Dye Set (Ensemble de colorants)	par exemple, BT6	par exemple, BT6
Run Module (Module de cycle)	HID36_POP4	HID36_POP4
Protocol Name (Nom du protocole)	par exemple, Investigator 24plex	par exemple, Investigator 24plex
Oven Temperature (°C) (Température du four en °C)	Par défaut (60)	Par défaut (60)
Run Voltage (Tension de cycle) (kV)	13,0	13,0
Pre-Run Voltage (Tension de pré-cycle) (kV)	Par défaut (15)	Par défaut (15)
Injection Voltage (Tension d'injection) (kV)	1,2	1,6
Run Time (Durée de cycle) (s)	1550	1550
PreRun Time (Durée de pré-cycle) (s)	Par défaut (180)	Par défaut (180)
Injection Time (Durée d'injection) (s)	30,0*	33,0*
Data Delay (Délai d'attente des données) (s)	Par défaut (1)	Par défaut (1)
Advanced Options (Options avancées)	Par défaut	Par défaut

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

Taille standard

1. Pour configurer la taille standard, sélectionnez « Library » (Bibliothèque) sous « Analyze » (Analyser). Accédez ensuite à « Size Standards » (Tailles standard) puis cliquez sur « Create » (Créer).
2. Les paramètres indiqués dans le Tableau 16 doivent être saisis ou sélectionnés.
Il convient d'utiliser le DNA Size Standard 24plex (BTO) avec les longueurs de fragments suivantes : 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 et 550 bp.
3. Il est également possible d'importer les paramètres du DNA Size Standard 24plex (BTO) à l'aide du fichier de modèle Investigator recommandé « SST-BTO_60-500bp » (Tableau 21, page 40).
4. Cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour confirmer les modifications.

Tableau 16. Paramètres de la taille standard

Paramètre	Valeur
Size Standard (Taille standard)	par exemple, SST-BTO_60-500bp
Dye Color (Couleur du colorant)	Orange

Protocole de CQ

1. Pour configurer le protocole de CQ, sélectionner « Library » (Bibliothèque) sous « Analyze » (Analyser). Accéder ensuite à « QC Protocols » (Protocoles de CQ) puis cliquer sur « Create » (Créer).
2. Les paramètres indiqués dans le Tableau 17 doivent être saisis ou sélectionnés.

Tableau 17. Paramètres du protocole de CQ

Paramètre	Valeur
Protocol Name (Nom du protocole)	par exemple, BTO_550
Size Standard (Taille standard)	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller (Système d'assignation des tailles)	SizeCaller v1.1.0

3. Aller à « Analysis Settings » (Paramètres d'analyse) puis « Peak Amplitude Threshold » (Seuil d'amplitude des pics) et s'assurer que toutes les couleurs sont activées.
Vérifiez les paramètres d'analyse recommandés dans le Tableau 20, page 38.
Tous les autres paramètres doivent conserver leur valeur par défaut.
4. Cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour confirmer les modifications.

Dosage

1. Pour configurer un dosage, sélectionnez « Library » (Bibliothèque) sous « Manage » (Gérer). Accédez ensuite à « Assays » (Dosages) puis cliquez sur « Create » (Créer).
2. Pour analyser les fragments du kit Investigator 24plex, les paramètres indiqués dans le Tableau 18 doivent être sélectionnés.
3. Cliquer sur « Save » (Enregistrer) pour confirmer les modifications.

Tableau 18. Paramètres de dosage

Paramètre	Valeur
Assay Name (Nom du dosage)	par exemple, Investigator 24plex
Color (Couleur)	Par défaut
Application Type (Type d'application)	HID
Instrument Protocol (Protocole de l'appareil)	par exemple, Investigator 24plex
QC Protocols (Protocoles de CQ)	par exemple, BTO_550

Démarrage du cycle

1. Dans le tableau de bord, cliquer sur « Create New Plate » (Créer nouvelle plaque).
2. Aller à « Setup » (Configurer) puis « Define Plate Properties » (Définir les propriétés de la plaque) et sélectionner « Plate Details » (Détails de la plaque). Sélectionner ou saisir les paramètres fournis au Tableau 19.

Tableau 19. Propriétés de la plaque

Propriété	Valeur
Name (Nom)	par exemple, Investigator 24plex
Number of Wells (Nombre de puits)	96
Plate Type (Type de plaque)	HID
Capillary Length (Longueur des capillaires)	36 cm
Polymer (Polymère)	POP4

3. Cliquer sur « Assign Plate Contents » (Attribuer le contenu de la plaque) pour confirmer les modifications.
4. Saisir le nom de l'échantillon correspondant dans chacun des puits contenant un échantillon ou une échelle allélique. Cette opération permet d'identifier les positions des puits de chaque échantillon à des fins de collecte et de traitement des données.
5. Sous « Assay » (Dosage), choisir le dosage approprié. Si vous avez suivi les étapes sous « Configuration d'un cycle » (voir page 33 et suivantes), cliquez sur « Add from Library » (Ajouter depuis la bibliothèque) et sélectionnez Investigator 24plex comme « Instrument Protocol » (Protocole d'appareil). Un dosage doit être attribué à tous les puits nommés de la plaque.
6. Répéter l'opération pour les « File name conventions » (Conventions de noms de fichiers) et « Results group » (Groupe de résultats).
7. Sélectionner les puits pour lesquels un dosage doit être spécifié. Cocher les cases en regard des noms de « Assay » (Dosage), « File name conventions » (Conventions de nom de fichiers) et « Results group » (Groupe de résultats) pour les attribuer aux puits sélectionnés.

8. Si ce n'est déjà fait, charger la plaque assemblée dans l'appareil et fermer la porte de celui-ci pour le réinitialiser. Cliquer ensuite sur « Link Plate for Run » (Lier la plaque pour le cycle). Dans l'écran suivant, renseigner le champ « Run Name » (Nom de cycle) et cliquer sur « Start Run » (Démarrer le cycle).

Paramètres et méthode d'analyse

Le Tableau 20 dresse la liste des paramètres d'analyse recommandés pour la fiche de travail Peak Detector (DéTECTEUR de pics).

Tableau 20. Paramètres recommandés pour le séquenceur Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer

Paramètre	Valeurs
Peak Detection Algorithm (Algorithme de détection des pics)	Advanced (Avancé)
Ranges (Plages)	Analysis (Analyse) : Partial Range (Plage partielle) Start Point (Point de départ) : 1 000 ; Stop Point (Point d'arrivée) : 20 000 Sizing (Dimensionnement) : All Sizes (Toutes les tailles)
Smoothing and Baselineing (Lissage et ligne de base)	Smoothing (Lissage) : Light (Léger) Baseline Window (Fenêtre de la ligne de base) : 51 pts
Size Calling Method (Méthode d'assignation des tailles)	Local Southern Method (Méthode locale de Southern)
Peak Detection (Détection des pics)	Peak Amplitude Thresholds (Seuils d'amplitude des pics) B :* Y :* G :* R :* P :* O :* Min. Peak Half Width (Demi-largeur minimum de pic) : 2 pts Polynomial Degree (Degré polynomial) : 3 Peak Window Size (Taille de fenêtre de pic) : 11 pts [†] Slope Thresholds (Seuils de pente) : 0,0

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

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

[†] Seul le paramètre Peak Window Size (Taille de fenêtre de pic) diffère des valeurs par défaut d'Applied Biosystems pour l'analyse d'identification humaine.

Protocole : analyse

Pour des instructions générales sur l'analyse automatique des échantillons, consultez le Guide d'utilisation approprié du logiciel GeneMapper *ID-X* Software.

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

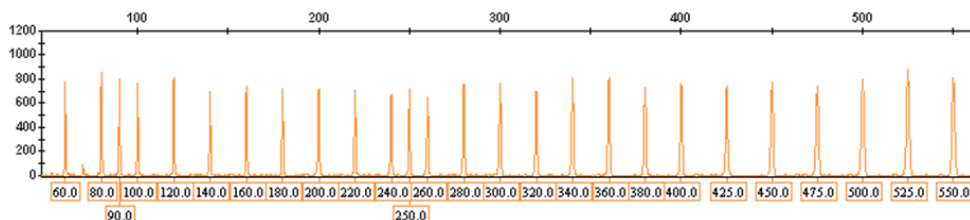


Figure 4. Électrophérogramme des fragments de DNA Size Standard 24plex (BTO), longueurs en pb.

Logiciel d'analyse

Il convient de procéder à la localisation des allèles à l'aide d'un logiciel d'analyse adapté, p. ex. le GeneMapper *ID-X* Software avec les fichiers de modèles Investigator disponibles au téléchargement sur www.qiagen.com, voir le Tableau 21, page 40.

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

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

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

Contrôles

Les allèles répertoriés au Tableau 22 représentent le Control DNA 9948 (inclus dans le Investigator 24plex GO! Kit) et l'ADN provenant d'autres souches cellulaires normalisées disponibles dans le commerce.

Tableau 22. Localisation des allèles du Investigator 24plex GO! Kit

Locus	CCR 9948	CCR 9947A	CCR 3657
Amélogénine	X/Y	X/X	X/Y
DYS391	10/10	–	10/10
D1S1656	14/17	18,3/18,3	13/18,3
D2S441	11/12	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	18/22
D3S1358	15/17	14/15	16/18
D5S818	11/13	11/11	11/11

Suite du tableau sur la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

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

Pour confirmation, le Tableau 22 liste les allèles d'ADN de référence achetés auprès du Coriell Cell Repositories (CCR) ainsi que 2 ADN de référence achetés auprès du CCR conformes à l'article de Szibor et al. (2).

Capteur de qualité

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

Pour corriger le problème de similarité des séquences et de possibilité de liaison non spécifique, un ADN matrice synthétique interne de contrôle a été créé à l'aide d'un algorithme aléatoire. La séquence du modèle diffère de toutes les séquences d'ADN connues et en particulier, elle ne ressemble en rien à l'ADN humain. En conséquence, le risque d'une liaison non spécifique dans le contexte d'une réaction d'amplification de la PCR multiplex est très faible.

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

Des expériences sur la sensibilité ont révélé que les contrôles internes n'avaient aucun effet sur la performance de la PCR. L'amplification de petites quantités de modèle d'ADN a fait apparaître des résultats similaires pour les mélanges d'amorce avec ou sans les capteurs de qualité.

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

Dans le cas d'une dégradation d'échantillon, l'amplification de fragments cibles plus petits est plus efficace que l'amplification de fragments cibles plus gros. Toutefois, la dégradation du modèle cible ne nuit pas à l'amplification des fragments de contrôle internes par rapport au modèle de contrôle interne (Figure 5). Ainsi, un rapport égal de QS1 et QS2 et un rapport favorable aux produits cibles STR suggèrent une dégradation de l'échantillon.

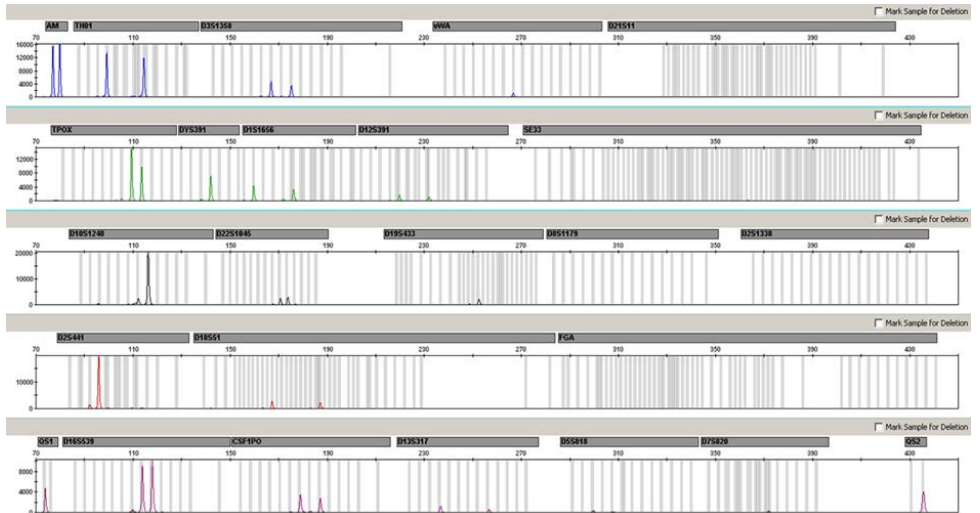


Figure 5. Électrophérogramme de l'analyse de marqueurs STR en présence d'ADN dégradé (fragments de 150 pb). L'ADN génomique a été divisé en fragments de 150 pb par ultrasons. Les gros fragments STR ont été amplifiés avec un très faible rendement de PCR mais QS1 et QS2 ont été amplifiés normalement avec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

Si des inhibiteurs tels que l'hématine sont présents dans l'échantillon en concentrations importantes, l'amplification est moins efficace et les fragments d'ADN plus gros sont amplifiés moins bien que les plus petits. Si l'analyse des produits d'amplification indique une amplification non efficace des séquences cibles STR plus grosses et du fragment du capteur de qualité (QS2) plus gros tandis que le capteur de qualité (QS1) plus petit est amplifié correctement, l'échantillon est vraisemblablement contaminé par des inhibiteurs.

Cela indique qu'un décalage du rapport favorable au petit capteur de qualité (QS1) suggère la présence d'inhibiteurs (Figure 6).

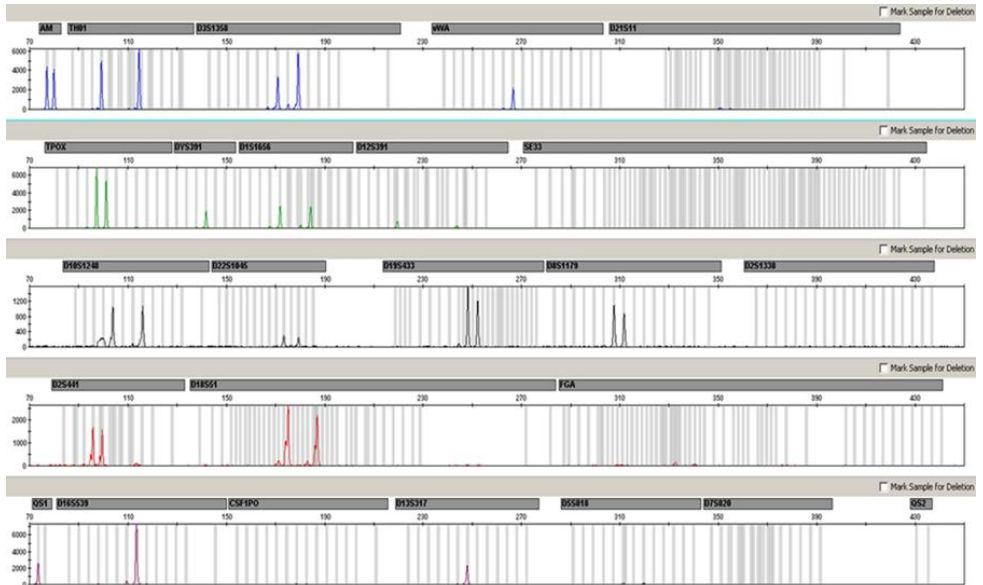


Figure 6. Électrophérogramme de l'analyse de marqueurs STR en présence d'hématine. Vingt-deux marqueurs STR, l'amélogénine et les deux capteurs de qualité ont été amplifiés en présence de 1 000 µM d'hématine puis analysés par électrophorèse capillaire. L'amplification des fragments de poids moléculaire élevé, y compris les marqueurs STR de plus de 250 pb et QS2, a été inhibée par la forte teneur en hématine. Les marqueurs apparaissent en haut de l'électrophérogramme. Les capteurs de qualité sont marqués par le marqueur BTP (Panneau 5) et apparaissent sous forme de tailles de fragment de 74 pb (QS1) et 435 pb (QS2, non visible).

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

Le Tableau 23, page 45 récapitule les aspects possibles du profil et leurs significations.

Tableau 23. Aspects du profil et significations

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

Remarque : les réactifs d'amplification pour les deux capteurs de qualité sont limités dans la réaction d'amplification Investigator 24plex GO!, autrement dit la hauteur de pic maximale est déjà atteinte avec 25 cycles. L'augmentation du nombre de cycles, en passant par exemple à 26 ou 27, n'augmentera donc pas la hauteur de pic des capteurs de qualité.

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

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

Allèles

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

Échelle

- Horizontale : 70 à 470 pb
- Verticale : selon l'intensité des signaux

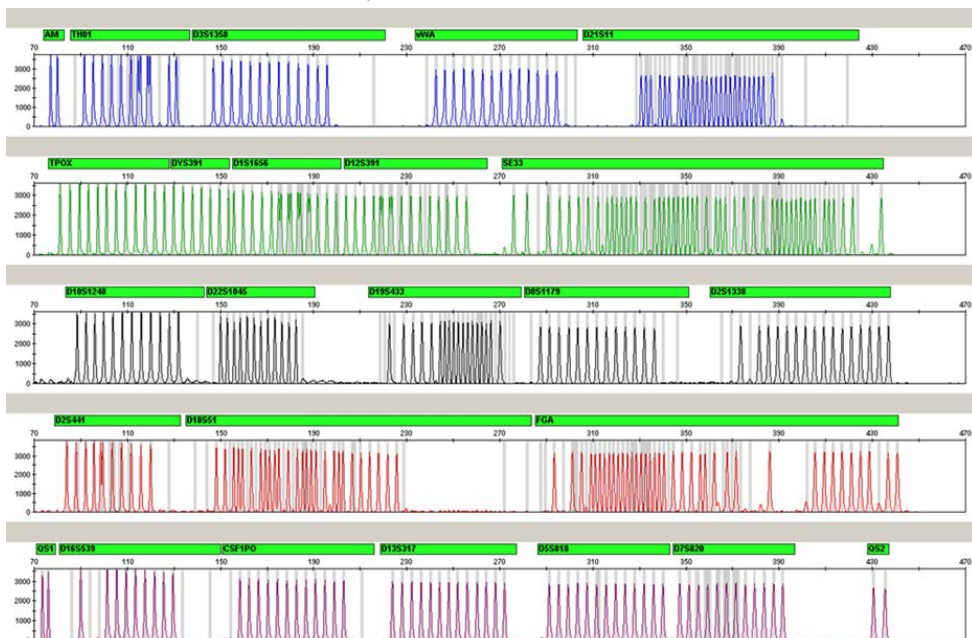


Figure 7. Électrophérogramme de l'échelle allélique 24plex analysé sur le séquenceur Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. L'échelle allélique comprend deux allèles pour chaque capteur de qualité (QS1 et QS2). Cela permet l'appel automatique des pics de capteur de qualité pour l'analyse des échantillons.

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

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

Suite du tableau sur la page suivante

Suite du tableau de la page précédente

Locus	Marqueur de fluorescence	Nombres de répétitions de l'échelle allélique
D2S441	BTR2	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR2	8, 9, 10, 10,2, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 16, 17, 17,2, 18, 18,2, 19, 20, 21, 21,2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
FGA	BTR2	14, 16, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23, 23,2, 24, 24,2, 25, 25,2, 26, 27, 28, 29, 30, 30,2, 31,2, 33, 34, 37,2, 42,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2, 47,2, 48,2, 50,2, 51,2
QS1	BTP	Q, S
D16S539	BTP	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
CSF1PO	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D13S317	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D5S818	BTP	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
D7S820	BTP	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
QS2	BTP	Q, S

Pour en savoir plus sur les microvariants non inclus dans l'échelle allélique du Investigator 24plex, consulter le site Internet de l'institut national des normes et technologies (National Institute of Standards and Technology, NIST) (www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Guide de résolution des problèmes

Ce guide peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, consulter également la page de la foire aux questions (Frequently Asked Questions, FAQ) dans notre Centre d'assistance technique à l'adresse suivante : www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations ou les protocoles figurant dans ce manuel (pour les coordonnées, visiter le site support.qiagen.com).

Commentaires et suggestions

De nombreux échantillons affichent des allèles hors échelle

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

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

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

Profils déséquilibrés, signaux faibles

- | | |
|--|--|
| a) Volume de Fast Reaction Mix 2.0 ou de mélange d'amorces incorrect | Vérifier la configuration de la réaction et répéter l'amplification. |
| b) Mélange principal non vortexé avant distribution | Mélanger soigneusement au vortex le mélange principal, puis centrifuger brièvement. |
| c) Volume d'échantillon trop important | Ne pas utiliser plus d'un prélèvement de 1,2 mm ni des prélèvements d'un diamètre supérieur. |

Commentaires et suggestions

Dominance des pics des capteurs de qualité

Les pics de QS1 et de QS2 sont trop dominants

Avec le GeneMapper *ID-X* Software, sous « Display Settings » (Paramètres d'affichage), choisir un nouveau paramètre pour le zoom avant de « all-dye range » (Plage de tous les fluorophores). La plage doit se trouver entre QS1 et QS2.

Important : en outre, dans « Analysis Method Editor » (Éditeur de méthode d'analyse), sous « peak detector » (Détecteur de pics), ajuster l'assignation des tailles (Plages ; taille) à 75 -> 450.

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

Chute de la hauteur de pic de QS1 et QS2

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

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

Les échantillons sur écouvillons affichent un signal faible pour les marqueurs de masse moléculaire élevée

Lyse incomplète

Effectuer une lyse facultative à 95 °C.

Préparation des échantillons

L'intensité du signal de l'échantillon doit être augmentée

Réduire le volume de DNA Size Standard 24plex (BTO) de manière à obtenir des hauteurs de pics d'environ 500 RFU.

Purifier les produits de la PCR avant de commencer l'analyse. Il est recommandé d'utiliser le kit MinElute® PCR Purification Kit (N° de réf. QIAGEN 28004 et 28006) pour une purification rapide et efficace

Matrice ou étalonnage spectral inadapté(e)

Avec la matrice/l'étalonnage spectral actuel(le), des pics de remontée entre les panels de fluorophores (B, G, Y, R, P, O) sont observés

Cette matrice ne doit pas être utilisée pour l'analyse. Répéter la génération de la matrice/l'étalonnage spectral. Veiller à suivre scrupuleusement le protocole adapté au séquenceur utilisé.

Commentaires et suggestions

Marquage de nombreux pics d'échantillons comme des allèles situés en dehors de l'échelle (Off-Ladder, OL)

- | | |
|--|--|
| a) Le DNA Size Standard 24plex (BTO) n'a pas été bien défini ou identifié | Dans la barre d'outils supérieure du logiciel GeneMapper ID ou GeneMapper ID-X Software, cliquez sur l'icône orange « Size Match Editor » (Éditeur d'appariement des tailles). Noter les fragments orange de tous les échantillons.

Utiliser toujours le DNA Size Standard 24plex inclus dans les Investigator Human Identification PCR Kits. |
| b) L'intensité des signaux est trop élevée Si la hauteur des pics des échantillons se trouve hors de la plage de détection linéaire (>5 000 RFU avec les séquenceurs Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers), il se peut que les pics de stutter, les pics multiples et les interférences soient plus importants | Réduire la durée d'injection par incréments jusqu'à un minimum de 1 s, réduire la quantité de produit d'amplification de la PCR pour l'analyse ou réduire la quantité d'ADN pour la PCR. |
| c) La présence de bulles dans le capillaire entraîne des pics de remontée dans les panels de couleurs (« pics parasites ») et conduit ainsi à une mauvaise localisation d'allèles. | Répéter l'électrophorèse pour confirmer les résultats. Vérifier le nombre maximum d'injections recommandé par le fabricant de l'appareil. Configurer un nouveau jeu de capillaires, si nécessaire. |
| d) Les différences de performances de cycle entre les capillaires d'un séquenceur multicapillaire peuvent entraîner un décalage dans la localisation des allèles | Afin d'assurer la fiabilité de la localisation des allèles avec les séquenceurs multicapillaires, il convient d'utiliser plusieurs échelles alléliques. |
| e) La faible température de l'air ambiant ou des tampons CE peut entraîner un déplacement de fragment ou des pics hors échelle | Veillez à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil. Veillez aussi à équilibrer les tampons en fonction des conditions ambiantes. Le préchauffage de l'appareil de CE (~30 min) est recommandé par le fabricant de l'appareil. |

Commentaires et suggestions

Injection ou fichier de l'échelle allélique inadaptés

- | | |
|--|---|
| a) Un signal supplémentaire peut être identifié comme un pic de l'échelle allélique en raison d'un dysfonctionnement au cours de l'électrophorèse. Si les pics de l'échelle allélique ne sont pas correctement assignés, cette échelle ne doit pas être utilisée pour l'analyse. | Utiliser une autre injection ou un autre fichier d'échelle allélique et vérifier les données de taille des fragments de l'échelle allélique déterminées à l'aide de la taille standard (en pb).
Toujours utiliser le DNA Size Standard 24plex avec les Investigator Human Identification PCR Kits. |
| b) Un pic de l'échelle allélique se trouve au-dessous du seuil de détection (50 à 200 RFU) de la méthode d'analyse employée et n'est donc pas identifié. | L'échelle allélique doit être chargée sur l'analyseur à une concentration supérieure à celle des échantillons à analyser.
Il est également possible d'analyser les données de l'échelle allélique en définissant un seuil de détection des pics inférieur dans le logiciel d'analyse. |
| c) Un pic de l'échelle allélique n'est pas identifié, car il se trouve en dehors de la plage de tailles attendues définie dans le logiciel (en pb). | Comparer la longueur des fragments (en pb) du premier allèle pour une couleur de l'échelle allélique avec la valeur correspondante des catégories. La comparer ensuite à celle des autres allèles. |
| d) Les allèles fractionnaires sont introuvables. | Les allèles fractionnaires sont des allèles présentant une différence d'au moins 1 pb avec l'allèle entier suivant. Vérifier les paramètres de la méthode d'analyse. Réduire la valeur du paramètre Peak Window Size (Taille de fenêtre de pic) à 11 points. |

Références

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**, 175.
2. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics — the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

Annexe A : interprétation des résultats

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

Procédure générale d'analyse

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

Pics de remontée (pull-up peaks)

Des pics de remontée peuvent apparaître si la hauteur des pics se trouve hors de la plage de détection linéaire (voir Guide de résolution des problèmes, page 49) ou en cas d'application d'une matrice incorrecte. Ils apparaissent à des positions spécifiques dans les canaux des autres couleurs, généralement avec une intensité de signal plus faible. Afin d'éviter leur apparition, la hauteur des pics ne doit pas dépasser les seuils.

Pics de stutter

L'apparition de pics de stutter dépend de la séquence de la structure répétée et du nombre d'allèles. Les pics $n-4$ sont dus à la perte d'une unité répétée au cours de l'amplification de motifs tétranucléotidiques de STR en raison des effets de dérapage du Taq ADN polymérase, tandis que les pics $n-3$ apparaissent en particulier pendant l'amplification du motif trinuécléotidique du STR D22S1045. Il convient d'interpréter ces pics à l'aide des fichiers de modèles Investigator pour le GeneMapper *ID-X* Software.

Addition nucléotidique indépendante du modèle

En raison de l'activité de la transférase terminale, le Taq ADN polymérase peut entraîner une adénylation incomplète à l'extrémité 3' des fragments d'ADN amplifiés. Ce pic d'interférence est plus court d'une base par rapport au pic attendu (pics -1). Toutes les amorces incluses au Investigator 24plex GO! Kit sont conçues pour limiter ces interférences. La hauteur des pics interférentiels est proportionnelle à la quantité d'ADN. Il revient aux laboratoires de définir leurs propres limites pour l'analyse de ces pics.

Interférences

La température ambiante peut affecter la performance des produits de PCR sur les séquenceurs multicapillaires, générant des épaulements ou des pics multiples. En cas d'apparition de tels phénomènes, il est recommandé de réinjecter l'échantillon. Veillez à maintenir des conditions ambiantes conformes aux recommandations du fabricant de l'appareil. Veillez aussi à équilibrer les tampons en fonction des conditions ambiantes.

Annexe B : changement des volumes de PCR avec le Investigator 24plex GO! Kit

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

Sang ou cellules buccales sur applicateur FTA ou autre papier

Nous recommandons d'utiliser le Investigator STR GO! Punch Buffer pour corriger l'éventuelle inhibition due au papier. Ajoutez 2 µl de STR GO! Punch Buffer quel que soit le volume final de mélange réactionnel.

Lysats sur écouvillons buccaux

Nous recommandons de réduire le volume de lysat ajouté en fonction de la réduction du volume de mélange réactionnel, p. ex. 1 µl de lysat pour la moitié de mélange réactionnel. Des volumes d'entrée plus importants donnent une inhibition des amplifications par PCR.

Pour commander

Produit	Contenu	N° de réf.
Investigator 24plex GO! Kit (200)	Mélange d'amorces, Fast Reaction Mix 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO)	382426
Investigator 24plex GO! Kit (1000)	Mélange d'amorces, Fast Reaction Mix 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO)	382428
Produits assimilés		
Matrix Standard BT6 (50)	Matrice étalon pour 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP et BTO, pour les séquenceurs Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers	386224
Investigator STR GO! Lysis Buffer (200)	Tampon de lyse pour 200 échantillons sur écouvillons	386516
Investigator STR GO! Punch Buffer (1000)	Tampon à prélèvement pour 1 000 échantillons de cellules épithéliales sur papier	386528
Investigator STR GO! Punch Buffer (200)	Tampon à prélèvement pour 200 échantillons de cellules épithéliales sur papier	386526
Investigator Human Identification PCR Kits		
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Pour une utilisation sur les systèmes Applied Biosystems 7500 Real-Time : Quantiplex Pro Reaction Mix, Quantiplex Pro Primer Mix, Quantiplex Pro Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387216

Produit	Contenu	N° de réf.
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Pour une utilisation sur les systèmes QIAGEN Rotor-Gene® Q Real-Time : Quantiplex Pro RGQ Reaction Mix, Quantiplex Pro RGQ Primer Mix, Male Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer	387316
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Mélange d'amorces, Fast Reaction Mix 2.0, ADN de contrôle, échelle allélique 24plex, DNA Size Standard 24plex (BTO) et eau sans nucléase	382415

* Des kits plus grands sont disponibles, contactez-nous pour en savoir plus.

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

Historique des révisions du document

Date	Modifications
R4 12/2017	Ajout du protocole optimisé et d'information sur les Bode Buccal DNA Collectors (pages 10, 14, 17 à 19)
R5 11/2018	Ajout de l'annexe B
R6 04/2019	Modification de l'étape 3 et ajout d'une note au Tableau 2 dans « Protocole : amplification par PCR à partir de sang sur applicateur FTA et autre papier »
R7 12/2020	Ajout d'une extension finale en option. Mise à jour de la section « Pour commander ».
R8 02/2021	Le tableau 3 est divisé en tableaux 3a et 3b, le tableau 5 est divisé en tableaux 5a et 5b, le tableau 7 est divisé en tableaux 7a et 7b et le tableau 9 est divisé en tableaux 9a et 9b. Ajout de « Veriti™ 96-Well Thermal Cycler » et « ProFlex™ 96-well PCR System » à la section « Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur ».

Remarques

Accord de licence limitée pour l'Investigator 24plex GO! Kit

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

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

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamplifier®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group) ; Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ; Bode Buccal DNA Collector™ (Bode Cllmark Forensics) ; Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG) ; ABI PRISM®, Applied Biosystems®, 6-FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Hi-Di™, POP-4™, ProFlex™, Veriti™ (Thermo Fisher Scientific ou ses filiales) ; GenBank® (US Department of Health and Human Services (Ministère américain de la Santé et des Services sociaux)), FTA®, (Whatman Group). Les noms déposés, les marques commerciales, etc., cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

02/2021 HB-1913-008 © 2021 QIAGEN, tous droits réservés.

Pour commander www.qiagen.com/shop | Assistance technique support.qiagen.com | Site Web www.qiagen.com