



Aprile 2024

# Manuale di Investigator 24plex GO! Kit

Per l'amplificazione multiplex dei loci CODIS, della serie di loci europei standard, oltre a SE33, DYS391 e amelogenina

Riservato

# Indice

|  |    |
|--|----|
| Contenuto del kit.....   | 4  |
| Trasporto e conservazione.....   | 5  |
| Uso previsto.....  | 6  |
| Informazioni sulla sicurezza.....  | 7  |
| Controllo di qualità.....  | 8  |
| Introduzione.....  | 9  |
| Apparecchi e reagenti a carico dell'utilizzatore.....                                      | 12 |
| Tutti i protocolli.....  | 12 |
| Per protocolli basati su sangue o cellule orali su carta.....                              | 13 |
| Per protocolli basati su cellule orali su carta.....                                       | 13 |
| Per il protocollo basato su cellule orali su Bode Buccal DNA Collector™.....               | 13 |
| Per protocolli basati su lisati di tampone orale.....                                      | 13 |
| Software di analisi della validità per i prodotti per identificazione umana.....           | 13 |
| Note importanti.....   | 14 |
| Protocollo: amplificazione mediante PCR da sangue su FTA e altra carta.....                | 15 |
| Aspetti importanti da considerare prima di iniziare.....                                   | 15 |
| Operazioni da eseguire prima di iniziare.....  | 15 |
| Procedura.....   | 15 |
| Protocollo: amplificazione mediante PCR da cellule orali su FTA e altra carta.....         | 19 |
| Aspetti importanti da considerare prima di iniziare.....                                   | 19 |
| Operazioni da eseguire prima di iniziare.....  | 19 |
| Procedura.....   | 19 |
| Protocollo: amplificazione mediante PCR da cellule orali da Bode Buccal DNA Collector..... | 23 |
| Aspetti importanti da considerare prima di iniziare.....                                   | 23 |
| Operazioni da eseguire prima di iniziare.....  | 23 |
| Procedura.....   | 23 |
| Protocollo: amplificazione mediante PCR da lisati di tampone orale.....                    | 27 |
| Aspetti importanti da considerare prima di iniziare.....                                   | 27 |
| Operazioni da eseguire prima di iniziare.....  | 27 |
| Procedura.....   | 27 |

|   |    |
|---|----|
| Protocollo: elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer ..... | 30 |
| Calibrazione spettrale/generazione di matrice .....   | 31 |
| Preparazione dei campioni .....   | 38 |
| Configurazione di un processo .....   | 39 |
| Avvio del processo .....  | 43 |
| Parametri dell'analisi/metodo dell'analisi .....  | 44 |
| Protocollo: analisi .....   | 46 |
| Software di analisi .....   | 46 |
| Controlli .....   | 47 |
| Sensore di qualità .....  | 49 |
| Alleli .....  | 53 |
| Guida alla risoluzione dei problemi .....   | 57 |
| Riferimenti bibliografici .....   | 61 |
| Appendice A: interpretazione dei risultati .....  | 62 |
| Procedura generale per l'analisi .....  | 62 |
| Picchi pull-up .....  | 62 |
| Picchi di stutter .....   | 62 |
| Aggiunta di nucleotidi indipendente dal template .....  | 63 |
| Artefatti .....   | 63 |
| Appendice B: Variazione di volumi PCR con l'Investigator 24plex GO! Kit .....                         | 64 |
| Sangue o cellule orali su FTA o altra carta .....   | 64 |
| Lisati di tampone orale .....   | 64 |
| Informazioni per gli ordini .....   | 65 |
| Cronologia delle revisioni del documento .....  | 67 |

# Contenuto del kit

| <b>Investigator 24plex GO! Kit</b>                | <b>(200)</b>     | <b>(1000)</b>     |
|---|------------------|-------------------|
| <b>Numero di catalogo</b>                         | <b>382426</b>    | <b>382428</b>     |
| <b>Numero di reazioni da 25 <math>\mu</math>L</b> | <b>200</b>       | <b>1000</b>       |
| Fast Reaction Mix 2.0*                            | 2 x 750 $\mu$ L  | 10 x 750 $\mu$ L  |
| Primer Mix 24plex GO!                             | 2 x 1250 $\mu$ L | 10 x 1250 $\mu$ L |
| Control DNA 9948 (5 ng/ $\mu$ L)                  | 50 $\mu$ L       | 50 $\mu$ L        |
| DNA size standard 24plex (BTO)                    | 110 $\mu$ L      | 5 x 110 $\mu$ L   |
| Allelic ladder (ladder allelico) 24plex           | 2 x 25 $\mu$ L   | 6 x 25 $\mu$ L    |
| Quick-Start Protocol (Protocollo Quick-Start)     | 1                | 1                 |

\* Contiene DNA polimerasi, dNTP, MgCl<sup>2</sup> e sieroalbumina bovina (BSA).

Riservato

## Trasporto e conservazione

L'Investigator 24plex GO! Kit viene spedito in ghiaccio secco. Al ricevimento deve essere immediatamente inserito in un freezer a temperatura costante compresa tra -30 °C e -15 °C. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti. La miscela di primer e il ladder allelico devono essere conservati al riparo dalla luce. I campioni di DNA e i reagenti post-PCR (ladder allelico e DNA size standard) vanno conservati separatamente dai reagenti PCR. In queste condizioni, i componenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit.

Dopo l'apertura, l'Investigator 24plex GO! Kit deve essere conservato a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi.

Riservato

## Uso previsto

L'Investigator 24plex GO! Kit è destinato ad applicazioni di biologia molecolare nelle analisi di medicina legale, identità umana e paternità. Il prodotto non è destinato alla diagnosi, alla prevenzione o al trattamento di malattie.

Manipolare i prodotti con la massima cura e attenzione. Consigliamo a tutti gli utenti dei prodotti QIAGEN® di attenersi alle direttive NIH sviluppate per gli esperimenti con DNA ricombinante o ad altre linee guida applicabili.

Riservato

## Informazioni sulla sicurezza

Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit QIAGEN e di ogni relativo componente.

Riservato

# Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità certificato ISO di QIAGEN, ogni lotto dell'Investigator 24plex GO! Kit è testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto. Manuale di Investigator 24plex GO! Kit soddisfa i requisiti ISO 18385.

Riservato



# Introduzione

L'Investigator 24plex GO! Kit viene utilizzato per la PCR Multiplex nelle analisi di medicina legale e nei test dell'identità umana e della paternità. La PCR amplifica contemporaneamente i 22 marcatori STR polimorfici elencati di seguito insieme al marcatore amelogenina sesso-specifico. Questi 22 marcatori sono consigliati dal gruppo di lavoro denominato "CODIS (Combined DNA Index System) Core Loci Working Group", dalla Rete europea degli Istituti di Scienza Forense (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) e dal gruppo europeo per la profilazione del DNA (European DNA Profiling Group, EDNAP).

La miscela di primer dell'Investigator 24plex GO! Kit contiene 2 controlli interni per PCR (i sensori di qualità QS1 e QS2), che forniscono informazioni utili sull'efficienza della PCR e sulla presenza di inibitori della PCR. I sensori di qualità vengono amplificati contemporaneamente ai marcatori STR polimorfici.

L'Investigator 24plex GO! Kit è stato appositamente sviluppato per l'amplificazione rapida diretta da sangue o cellule orali su FTA® e altri tipi di carta e tamponi orali. Il kit utilizza la tecnologia PCR a ciclaggio rapido di QIAGEN, che consente l'amplificazione in circa 45 minuti. I punch FTA e altre carte da filtro possono essere utilizzati senza che sia necessario alcun pretrattamento. Per i tamponi orali, un protocollo di lisi comodo e veloce genera un lisato grezzo per l'amplificazione in circa 5 minuti. I primer sono marcati a fluorescenza con i seguenti coloranti:

- 6-FAM™: Amelogenina, 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 quantità raccomandata di campione è di un punch di 1,2 mm di diametro per FTA e altre carte da filtro, o 2 µL di un lisato da tampone orale.

L'Investigator 24plex GO! Kit è stato convalidato mediante il GeneAmp® PCR System 9700 (con blocco in argento placcato oro a 96 pozzetti) e l'Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer.

La Tabella 1 mostra i loci STR con la relativa mappatura cromosomica e i motivi ripetuti, che sono concordi alle linee-guida della International Society for Forensic Genetics (ISFG) per l'uso di marcatori microsatelliti (1).

Per informazioni sulle microvarianti non contenute nel ladder allelico dell'Investigator 24plex, consultare il sito web del National Institute of Standards and Technology (NIST) ([www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/)).

**Tabella 1. Informazioni specifiche per loco dell'Investigator 24plex GO! Kit**

| Loco          | Numero di accesso a GenBank® | Motivo ripetuto dell'allele di riferimento                | Mappatura cromosomica |
|---------------|------------------------------|---|-----------------------|
| Amelogenina X | M55418                       | –   | Xp22.1-22.3           |
| Amelogenina Y | M55419                       | –   | Yp11.2                |
| DYS391        | AC011302                     | [TCTA] <sub>11</sub>                                      | Yq11.21               |
| D1S1656       | NC_000001.9                  | [TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG]1 [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                |
| D5S818        | G08446                       | [AGAT] <sub>11</sub>                                      | 5q23.2                |
| D7S820        | G08616                       | [GATA] <sub>12</sub>                                      | 7q21.11               |
| D8S1179       | G08710                       | [TCTA] <sub>12</sub>                                      | 8q23.1-23.2           |
| D10S1248      | AL391869                     | [GGAA] <sub>13</sub>                                      | 10q26.3               |

**Tabella 1. Informazioni specifiche per loco dell'Investigator 24plex GO! Kit (continua)**

| <b>Loco</b>   | <b>Numero di accesso a GenBank®</b> | <b>Motivo ripetuto dell'allele di riferimento</b>  | <b>Mappatura cromosomica</b> |
|---------------|-------------------------------------|--|------------------------------|
| D12S391       | G08921                              | [AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT                                       | 12p13.2                      |
| D13S317       | G09017                              | [TATC] <sub>13</sub>   | 13q31.1                      |
| 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> | 21q21.1                      |
| D22S1045      | AL022314                            | [ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>   | 22q12.3                      |
| CSF1PO        | X14720                              | [AGAT] <sub>12</sub>   | 5q33.1                       |
| FGA (FIBRA)   | M64982                              | [TTTC] <sub>3</sub> TTTTTCT [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                      |
| TPOX          | M68651                              | [AATG] <sub>11</sub>   | 2p25.3                       |
| vWA           | M25858                              | TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>  | 12p13.31                     |

Riservato

# Apparecchi e reagenti a carico dell'utilizzatore

Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

## Tutti i protocolli

- Hi-Di™ Formamide, 25 mL (Applied Biosystems, cat. no. 4311320)
- Matrix Standard BT6 per strumenti multicapillari (ad es. analizzatori genetici 3500)
- Pipette e puntali per pipette
- Uno dei seguenti analizzatori per DNA<sup>1</sup>:
  - Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer
  - Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer
- Uno sei seguenti termociclatori PCR<sup>1</sup>:
  - 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

<sup>1</sup> Questo elenco non è esaustivo e non include molti importanti fornitori di materiali biologici.

- Provette o piastre per PCR
- Microcentrifuga per provette o piastre per PCR

## Per protocolli basati su sangue o cellule orali su carta

- UniCore Punch Kit 1,2 mm (n. cat. WB100028)

## Per protocolli basati su cellule orali su carta

- Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) o (200) (QIAGEN, n. cat. 386528 o 386526)

## Per il protocollo basato su cellule orali su Bode Buccal DNA Collector™

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, n. cat. 386516)

## Per protocolli basati su lisati di tampone orale

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (QIAGEN, n. cat. 386516)
- Provette per microcentrifuga da 2 mL
- Agitatore per provette per microcentrifuga da 2 mL

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

Gli Investigator Human Identification PCR Kit devono essere calibrati con un ladder allelico. Pertanto il software usato deve essere compatibile con i prodotti per identificazione umana per applicazioni forensi. Raccomandiamo GeneMapper® ID-X. I file template Investigator facilitano l'analisi dei dati e sono validi con questo software.

Riservato

## Note importanti

Le condizioni sperimentali descritte nei protocolli sono quelle risultate con i migliori risultati. Tuttavia, a seconda del materiale del campione, i numeri dei cicli di PCR possono essere adattati per garantire le più alte percentuali di successo già dal primo ciclo. Si consiglia di processare un lotto rappresentativo di campioni per confermare che il numero di cicli indicati in questo protocollo sia ottimale. Aumentare il numero di cicli di uno se i segnali degli elettroferogrammi risultanti sono troppo bassi. Ridurre il numero di cicli di uno se i segnali degli elettroferogrammi risultanti sono troppo alti.

Riservato

# Protocollo: amplificazione mediante PCR da sangue su FTA e altra carta

Questo protocollo concerne l'amplificazione mediante PCR diretta di loci STR da punch di sangue su FTA e altra carta usando l'Investigator 24plex GO! Kit.

## Aspetti importanti da considerare prima di iniziare

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

## Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Prima di aprire le provette contenenti i componenti della PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

## Procedura

1. Prelevare un punch di 1,2 mm dal centro della macchia di sangue con uno strumento adatto (ad esempio, UniCore Punch Kit 1,2 mm, n. cat. WB100028).

**Importante:** non utilizzare più di un punch alla volta.

2. Preparare una miscela master come indicato nella Tabella 2, pagina 16.

Poiché si potrebbe perdere del reagente durante i travasi, preparare la miscela per una maggiore quantità di reazioni. Includere inoltre le reazioni di controllo positivo e negativo. La miscela master contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il DNA stampo (campione).

**Tabella 2. Preparazione della miscela master**

| <b>Componente</b>     | <b>Volume per reazione (µL)</b> |
|-----------------------|---------------------------------|
| Fast Reaction Mix 2.0 | 7,5                             |
| Miscela di primer     | 12,5                            |
| <b>Volume totale</b>  | <b>20,0</b>                     |

Nota: nel caso in cui il sangue dei campioni FTA sia stato conservato per periodi molto lunghi, si raccomanda l'uso di Investigator STR GO! Punch Buffer per superare l'eventuale inibizione. Aggiungere 3 µL di Investigator STR GO! Punch Buffer per reazione.

3. Agitare accuratamente la miscela di reazione su vortex, quindi distribuirne 20 µL (o 23 µL se si utilizza Investigator STR GO! Punch Buffer, n. cat. 386526 o 386528) nelle provette per PCR o nei pozzetti di una piastra per PCR.

4. Trasferire un dischetto da 1,2 mm in ogni reazione.

**Nota:** non miscelare la reazione dopo il trasferimento del dischetto.

5. Preparare i controlli positivi e negativi.

- Controllo positivo: Utilizzare 2 µL di DNA di controllo (cioè 10 ng).

**Nota:** se i segnali sono troppo bassi o troppo alti, potrebbe essere necessario adattare la quantità di DNA di controllo dopo aver impostato il numero di cicli PCR ottimali in laboratorio. Non aggiungere un dischetto vuoto al pozzetto di controllo positivo.

- Controllo negativo: non aggiungere nessun DNA stampo. Non aggiungere un dischetto vuoto o acqua nella provetta o al pozzetto per PCR del controllo negativo.

6. Centrifugare brevemente le reazioni per assicurare che i dischi siano completamente immersi.

7. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, alle condizioni riportate nella Tabella 3, pagina 18.



**Nota:** Se si usa un termociclatore GeneAmp 9700 con blocco in alluminio, usare **Std Mode** (Modo std); con blocco in argento o argento placcato oro, usare **Max Mode** (Modo max). Non usare **9600 Emulation Mode** (Modo emulazione 9600).

8. Dopo aver completato il protocollo di ciclaggio, conservare i campioni a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'esecuzione dell'elettroforesi.

Riservato

**Tabella 3a. Protocollo di ciclaggio standard per sangue su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3 cicli         |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 22 cicli        |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 5 min  | –               |
| 60               | 5 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

**Tabella 3b. Protocollo di ciclaggio facoltativo per sangue su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3 cicli         |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 22 cicli        |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 2 min  | –               |
| 60               | 2 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

La Tabella 3b illustra in dettaglio le condizioni di ciclaggio pubblicate in precedenza che potrebbero continuare a essere utilizzate se l'adenilazione incompleta non è visibile all'interno degli elettroferogrammi.

# Protocollo: amplificazione mediante PCR da cellule orali su FTA e altra carta

Questo protocollo concerne l'amplificazione mediante PCR diretta di loci STR da punch di cellule orali su FTA e altra carta usando l'Investigator 24plex GO! Kit. (per Bode Buccal DNA Collectors, vedere "Protocollo: amplificazione mediante PCR da cellule orali da Bode Buccal DNA Collector", pagina 23).

## Aspetti importanti da considerare prima di iniziare

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

## Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Prima di aprire le provette contenenti i componenti della PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

## Procedura

1. Prelevare un punch di 1,2 mm con uno strumento adatto (ad esempio, UniCore Punch Kit 1,2 mm, n. cat. WB100028).

**Nota:** per le cellule orali raccolte usando un dispositivo Indicating FTA Cards, prelevare il punch da un'area bianca. Questo colore indica che il trasferimento del campione è riuscito.

**Importante:** non utilizzare più di un punch alla volta.

2. Preparare una miscela master come indicato nella Tabella 4, pagina seguente.

Poiché si potrebbe perdere del reagente durante i travasi, preparare la miscela per una maggiore quantità di reazioni. Includere inoltre le reazioni di controllo positivo e negativo. La miscela master contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il DNA stampo (campione).

**Tabella 4. Preparazione della miscela master**

| Componente                        | Volume per reazione (µL) |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Fast Reaction Mix 2.0             | 7,5                      |
| Miscela di primer                 | 12,5                     |
| Investigator STR GO! Punch Buffer | 2,0                      |
| <b>Volume totale</b>              | <b>22,0</b>              |

3. Agitare accuratamente la miscela di reazione su vortex e distribuirne 22 µL nelle provette per PCR o nei pozzetti di una piastra per PCR.
4. Trasferire un dischetto da 1,2 mm in ogni reazione.

**Nota:** non miscelare la reazione dopo il trasferimento del dischetto.

5. Preparare i controlli positivi e negativi.
  - Controllo positivo: Utilizzare 1 µL di DNA di controllo (cioè 5 ng).

**Nota:** se i segnali sono troppo bassi o troppo alti, potrebbe essere necessario adattare la quantità di DNA di controllo dopo aver impostato il numero di cicli PCR ottimali in laboratorio. Non aggiungere un dischetto vuoto al pozzetto di controllo positivo.

- Controllo negativo: non aggiungere nessun DNA stampo. Non aggiungere un dischetto vuoto o acqua nella provetta o al pozzetto per PCR del controllo negativo.
6. Centrifugare brevemente le reazioni per assicurare che i dischi siano completamente immersi.
  7. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, alle condizioni riportate nella Tabella 5, pagina 22.

**Nota:** se si usa un termociclatore GeneAmp 9700 con blocco in alluminio, usare "Std Mode" (Modo std); con blocco in argento o argento placcato oro, usare "Max Mode" (Modo max). Non usare "9600 Emulation Mode" (Modo emulazione 9600).

8. Dopo aver completato il protocollo di ciclaggio, conservare i campioni a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'esecuzione dell'elettroforesi.

Riservato

**Tabella 5a. Protocollo di ciclaggio standard per cellule orali su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 23              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 5 min  | –               |
| 60               | 5 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

**Tabella 5b. Protocollo di ciclaggio facoltativo per cellule orali su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 23              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 2 min  | –               |
| 60               | 2 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

La Tabella 5b illustra in dettaglio le condizioni di ciclaggio pubblicate in precedenza che potrebbero continuare a essere utilizzate se l'adenilazione incompleta non è visibile all'interno degli elettroferogrammi.

# Protocollo: amplificazione mediante PCR da cellule orali da Bode Buccal DNA Collector

Questo protocollo concerne l'amplificazione mediante PCR diretta di loci STR da punch di cellule orali su Bode Buccal DNA Collector e altra carta usando l'Investigator 24plex GO! Kit.

## Aspetti importanti da considerare prima di iniziare

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

## Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Prima di aprire le provette contenenti i componenti della PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

## Procedura

1. Raccogliere un punch di 1,2 mm dalla punta (estremità arrotondata) del Bode Buccal DNA Collector con uno strumento adatto (ad es. UniCore Punch Kit 1,2 mm, n. cat. WB100028) in una piastra per PCR da 0,2 mL o in una provetta per PCR da 0,2 mL.

**Importante:** non utilizzare più di un punch alla volta per pozzetto o per provetta.

2. Aggiungere 2  $\mu$ l di Investigator STR GO! Kit Lysis Buffer direttamente sul punch da 1,2 mm. Se necessario, centrifugare brevemente per raccogliere il punch e il tampone sul fondo della piastra o della provetta.

3. Incubare il campione a 95 °C per 5 min. Non sigillare la piastra.

**Nota:** il tampone di lisi evaporerà.

4. Preparare una miscela master come indicato nella Tabella 6. Agitare accuratamente la miscela di reazione su vortex.

Poiché si potrebbe perdere del reagente durante i travasi, preparare la miscela per una maggiore quantità di reazioni. Includere inoltre le reazioni di controllo positivo e negativo. La miscela master contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il DNA stampo (campione).

**Tabella 6. Preparazione della miscela master**

| Componente            | Volume per reazione (µL) |
|-----------------------|--------------------------|
| Fast Reaction Mix 2.0 | 7,5                      |
| Miscela di primer     | 12,5                     |
| <b>Volume totale</b>  | <b>20,0</b>              |

5. Dopo l'incubazione, dispensare 20 µL di miscela master in ogni pozzetto della piastra o delle provette per PCR, contenente il punch di 1,2 mm.

**Nota:** non mescolare la reazione dopo aver distribuito la miscela master.

6. Preparare i controlli positivi e negativi.

- Controllo positivo: Utilizzare 2 µL di DNA di controllo (cioè 10 ng).

**Nota:** se i segnali sono troppo bassi o troppo alti, potrebbe essere necessario adattare la quantità di DNA di controllo dopo aver impostato il numero di cicli PCR ottimali in laboratorio. Non aggiungere un dischetto vuoto al pozzetto di controllo positivo.

- Controllo negativo: non aggiungere nessun DNA stampo. Non aggiungere un dischetto vuoto o acqua nella provetta o al pozzetto per PCR del controllo negativo.

7. Centrifugare brevemente le reazioni per assicurare che i dischi siano completamente immersi.



8. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, alle condizioni riportate nella Tabella 7a, pagina seguente.

**Nota:** Se si utilizza il GeneAmp PCR System 9700 con un modulo in blocco campione in alluminio, utilizzare "Std Mode" (Modo std). Se si utilizza un modulo in blocco in argento o argento placcato oro, utilizzare "Max Mode" (Modo max). Non usare "9600 Emulation Mode" (Modo emulazione 9600).

9. Dopo aver completato il protocollo di ciclaggio, conservare i campioni a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'esecuzione dell'elettroforesi.

Riservato

**Tabella 7a. Protocollo di ciclaggio standard per sangue su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 24              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 5 min  | –               |
| 60               | 5 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

**Tabella 7b. Protocollo di ciclaggio ottimale per sangue su FTA e altra carta**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 24              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 2 min  | –               |
| 60               | 2 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

La Tabella 7b illustra in dettaglio le condizioni di ciclaggio pubblicate in precedenza che potrebbero continuare a essere utilizzate se l'adenilazione incompleta non è visibile all'interno degli elettroferogrammi.

# Protocollo: amplificazione mediante PCR da lisati di tampone orale

Questo protocollo concerne l'amplificazione mediante PCR diretta di loci STR da lisati grezzi di tamponi orali usando l'Investigator 24plex GO! Kit.

## Aspetti importanti da considerare prima di iniziare

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

## Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Prima di aprire le provette contenenti i componenti della PCR, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

## Procedura

1. Posizionare il tampone in una provetta per microcentrifuga da 2 mL.

Tagliare, rompere o espellere con cautela la parte finale del tampone.

**Nota:** preparare un tampone vuoto come controllo negativo.

2. Aggiungere 500 µL di STR GO! Lysis Buffer al campione.
3. Incubare a 95 °C per 5 minuti agitando a 1200 giri/min in un termomixer.

**Opzionale:** incubare a temperatura ambiente per 5 minuti agitando a 1200 giri/min in un termomixer.

4. Preparare una miscela master come indicato nella Tabella 8.

Poiché si potrebbe perdere del reagente durante i travasi, preparare la miscela per una maggiore quantità di reazioni. Includere inoltre le reazioni di controllo positivo e negativo. La miscela master contiene tutti i componenti necessari per la PCR, tranne il DNA stampo (campione).

**Tabella 8. Preparazione della miscela master**

| Componente            | Volume per reazione (µL) |
|-----------------------|--------------------------|
| Fast Reaction Mix 2.0 | 7,5                      |
| Miscela di primer     | 12,5                     |
| <b>Volume totale</b>  | <b>20,0</b>              |

5. Agitare accuratamente la miscela di reazione su vortex e distribuirne 20 µL nelle provette per PCR o nei pozzetti di una piastra per PCR.
6. Miscelare accuratamente il tampone lisato e trasferirne 2 µL direttamente in ogni reazione.
7. Preparare i controlli positivi e negativi.
  - Controllo positivo: Utilizzare 1 µL di DNA di controllo (cioè 5 ng).

**Nota:** se i segnali sono troppo bassi o troppo alti, potrebbe essere necessario adattare la quantità di DNA di controllo dopo aver impostato il numero di cicli PCR ottimali in laboratorio. Non aggiungere un dischetto vuoto al pozzetto di controllo positivo.

- Controllo negativo: Utilizzare un lisato del tampone vuoto.
8. Programmare il termociclatore secondo le istruzioni del produttore, alle condizioni riportate nella Tabella 9, pagina 29.

**Nota:** se si usa un termociclatore GeneAmp 9700 con blocco in alluminio, usare "Std Mode" (Modo std); con blocco in argento o argento placcato oro, usare "Max Mode" (Modo max). Non usare "9600 Emulation Mode" (Modo emulazione 9600).

9. Dopo aver completato il protocollo di ciclaggio, conservare i campioni a una temperatura compresa tra -30 °C e -15 °C al riparo dalla luce o procedere direttamente con l'elettroforesi.

**Tabella 9a. Protocollo di ciclaggio standard per lisati da tamponi orali**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 24              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 5 min  | –               |
| 60               | 5 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

**Tabella 9b. Protocollo di ciclaggio facoltativo per lisati da tamponi orali**

| Temperatura (°C) | Durata | Numero di cicli |
|------------------|--------|-----------------|
| 98*              | 30 s   |                 |
| 64               | 40 s   | 3               |
| 72               | 5 s    |                 |
| 96               | 10 s   |                 |
| 61               | 40 s   | 24              |
| 72               | 5 s    |                 |
| 68               | 2 min  | –               |
| 60               | 2 min  | –               |
| 10               | ∞      | –               |

\*Hot start per attivare la DNA polimerasi.

La Tabella 9b illustra in dettaglio le condizioni di ciclaggio pubblicate in precedenza che potrebbero continuare a essere utilizzate se l'adenilazione incompleta non è visibile all'interno degli elettroferogrammi.

# Protocollo: elettroforesi mediante lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

L'Investigator 24plex GO! Kit è convalidato per l'uso sullo strumento 3500/3500xL Genetic Analyzer, che richiede il 3500 Data Collection Software v1 o v2 o il software HID Updater 3500 Data Collection v2.0.

**Nota:** per la scrittura dei dati sui file corretti, l'utente deve collegarsi al PC come amministratore locale o con diritti di accesso equivalenti.

Per istruzioni dettagliate sulla preparazione dello strumento, sulla calibrazione spettrale o sull'applicazione dell'Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software v1 o v2 e del GeneMapper ID-X Software v1.2, consultare la *Guida per l'utente dello strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*. Il sistema con 8 capillari è l'Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, quello con 24 capillari è l'Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

Il set di filtri virtuali AnyDye è usato per l'applicazione combinata dei 6 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO. Questo standard matrice è BT6.

I materiali occorrenti per l'elettroforesi sono indicati nella Tabella 10.

**Tabella 10. Materiali occorrenti per l'elettroforesi**

| Componente | Volume per reazione  |
|------------|--|
| Capillare  | Serie da 36 cm per lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer        |
| Polimero   | POP-4™ per lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer                |
| Tampone    | Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series<br>Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series |

## Calibrazione spettrale/generazione di matrice

Prima di eseguire l'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA, eseguire una calibrazione spettrale con i 6 marker fluorescenti 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO per ciascun analizzatore (Tabella 11).

La procedura di calibrazione crea una matrice che viene utilizzata per correggere la sovrapposizione degli spettri di emissione fluorescente dei coloranti.

**Importante:** la calibrazione spettrale deve essere eseguita per ogni nuova serie capillare. Comprende i seguenti passaggi:

- Preparazione dello strumento
- Preparazione della piastra di calibrazione standard
- Assemblaggio e caricamento della piastra nello strumento
- Preparazione via software del set di coloranti BT6
- Esecuzione di un processo di calibrazione spettrale
- Controllo della matrice

### Preparazione dello strumento

Prima di eseguire il processo di calibrazione spettrale, verificare che la calibrazione spaziale sia stata eseguita. Questo processo è descritto in maniera dettagliata nella *Guida per l'utente per lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

Riservato

**Tabella 11. I 6 marker fluorescenti di BT6**

| Colore        | Standard matrice |
|---------------|------------------|
| Blu (B)       | 6-FAM            |
| Verde (G)     | BTG              |
| Giallo (Y)    | BTY              |
| Rosso (R)     | BTR2             |
| Viola (P)     | BTP              |
| Arancione (O) | BTO              |

Preparazione della piastra di calibrazione standard per 8 capillari (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
2. Preparare una miscela di formamide e Matrix Standard BT6 in base alle informazioni nella Tabella 12.

**Tabella 12. Preparazione della miscela di formamide e Matrix Standard BT6 per 8 capillari**

| Componente                     | Volume ( $\mu$ L) |
|--------------------------------|-------------------|
| Hi-Di Formamide                | 90                |
| Matrix Standard BT6 multi cap. | 10                |

3. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
4. Caricare 10  $\mu$ L della miscela in ciascuno degli 8 pozzetti di una piastra da 96 pozzetti nelle posizioni da A1 a H1.
5. Denaturare per 3 minuti a 95 °C.
6. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4 °C.



## Preparazione della piastra di calibrazione standard per 24 capillari (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

1. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
2. Preparare una miscela di formammide e Matrix Standard BT6 in base alle informazioni nella Tabella 13.

**Tabella 13. Preparazione della miscela di formammide e Matrix Standard BT6 per 24 capillari**

| Componente                     | Volume (µL) |
|--------------------------------|-------------|
| Hi-Di Formamide                | 225         |
| Matrix Standard BT6 multi cap. | 25          |

3. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
4. Caricare 10 µL della miscela in ciascuno dei 24 pozzetti di una piastra da 96 pozzetti nelle posizioni A1–H1, A2–H2 e A3–H3.
5. Denaturare per 3 minuti a 95 °C.
6. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4 °C.

### Assemblaggio piastra e caricamento piastra nello strumento

Le fasi necessarie sono descritte in maniera dettagliata nella *Guida per l'utente per lo strumento Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

### Preparazione via software del set di coloranti BT6

Prima di eseguire la calibrazione spettrale, impostare un set di coloranti per Matrix Standard BT6.

1. Per creare un nuovo set di coloranti, selezionare **Library** (Libreria). Alla voce **Analyze** (Analizza) selezionare **Dye Sets** (Set di coloranti) e fare clic su **Create** (Crea).
2. Inserire un Dye Set Name (Nome set coloranti), ad esempio "BT6".
3. Alla voce **Chemistry** (Chimica), selezionare **Matrix Standard** (Standard matrice) e come **Dye Set Template** (Modello set di coloranti) selezionare **AnyDye Template** (Modello per qualsiasi colorante).
4. Alla voce **Calibration Peak Order** (Ordine picco di calibrazione) disporre i colori come segue: 6 – blu, 5 – arancione, 4 – verde, 3 – giallo, 2 – rosso, 1 – viola.

**Nota:** questa è l'impostazione corretta dell'ordine dei picchi nello strumento, anche se l'ordine dei picchi del Matrix Standard BT6 è diverso.

5. Modificare le impostazioni **Parameters** (Parametri) come segue:
  - Matrix Condition Number Upper Limit (Limite superiore per il numero di condizionamento della matrice): 13,5
  - Locate Start Point After Scan (Individuare il punto di inizio dopo la scansione): 1.000
  - Locate Start Point Before Scan (Individuare il punto di inizio prima della scansione): 5.000
  - Limit Scans To (Limitare le scansioni a): 2.750
  - Sensitivity (Sensibilità): 0,4
  - Minimum Quality Score (Punteggio minimo per la qualità): 0,95
6. Fare clic su **Save** (Salva) per confermare le modifiche.

Riservato

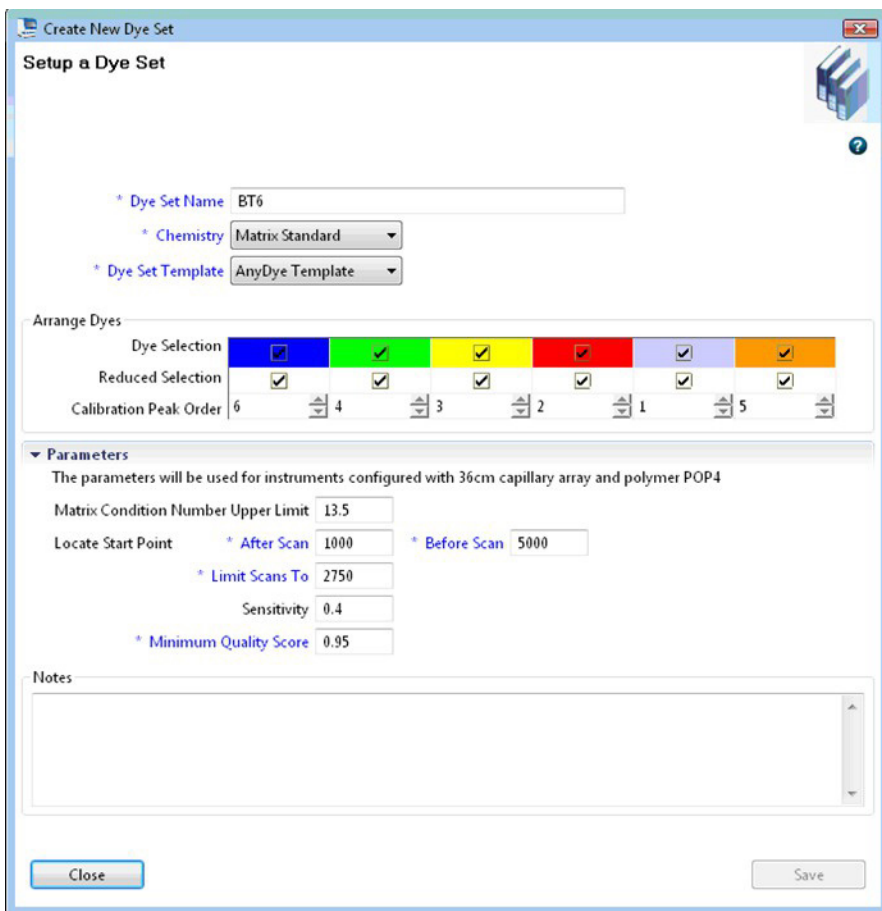


Figura 1. Configurazione del set di coloranti BT6.

## Esecuzione di un processo di calibrazione spettrale

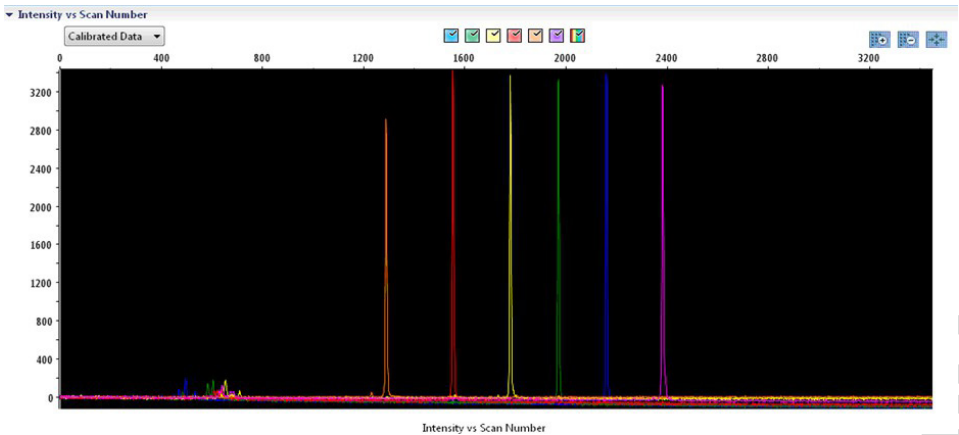
Dopo aver posizionato le piastre a pozzetti multipli che contengono la miscela di calibrazione spettrale sul vassoio dell'autocampionatore, è possibile avviare il processo di calibrazione spettrale.

1. Per accedere alla schermata Spectral Calibration (Calibrazione spettrale), selezionare **Maintenance** (Manutenzione) sulla dashboard del software 3500 Series Data Collection.
2. Per impostare un processo di calibrazione andare a **Calibrate** (Calibra), selezionare **Spectral** (Spettrale), quindi **Calibration Run** (Processo di calibrazione).
3. È necessario specificare il numero di pozzetti della piastra di calibrazione spettrale e la loro posizione nello strumento.
4. Alla voce **Chemistry Standard** (Standard chimica) selezionare **Matrix Standard** (Standard matrice) e come Dye Set Name (Nome set coloranti) selezionare, ad esempio, il BT6 creato in precedenza (fare riferimento a "Preparazione via software del set di coloranti BT6", pagina 33).
5. Opzionale: abilitare **Allow Borrowing** (Consenti acquisizione).
6. Fare clic su **Start Run** (Avvia processo).

### Controllo della matrice

Fare clic su un capillare nella tabella per visualizzare i risultati relativi a quel capillare sotto la tabella dei risultati del processo [Capillary (Capillare), Quality value (Valore qualità) e Condition Number (Numero di condizionamento)].

- Il valore qualità (valore Q) di ogni capillare deve essere superiore a 0,95 e il numero di condizionamento (valore C) deve essere compreso tra 1 e 13,5.
- Controllare se i campioni matrice hanno una baseline piatta. Come mostrato nella figura seguente, dovrebbero essere presenti almeno 6 picchi con altezze di circa 1000–6000 RFU per ogni campione matrice (Nota: il range ottimale è 3000-5000 RFU).



**Figura 2. Elettroferogramma di calibrazione spettrale del Matrix Standard BT6 su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.**

Al termine della corretta esecuzione di una calibrazione spettrale, sulla riga “Overall” (Generale) i risultati sono visualizzati in verde. Se sulla riga “Overall” (Generale) i risultati sono visualizzati in rosso, fare riferimento alla sezione “Risoluzione dei problemi di calibrazione spettrale” della *Guida per l’utente per lo strumento 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     | 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

**Figura 3. Esempio di calibrazione spettrale corretta del Matrix Standard BT6 per tutti i capillari su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.**

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

- L'ordine dei picchi nel profilo spettrale letto da sinistra a destra deve apparire arancione–rosso–giallo–verde–blu–viola.
- Nel profilo dei dati grezzi non deve comparire nessun picco estraneo
- La morfologia dei picchi nel profilo spettrale non deve presentare sovrapposizioni, cadute, nè altre irregolarità. I picchi devono essere visibili, separati e distinti.

Se i dati di tutti i capillari soddisfano i suddetti requisiti, fare clic su **Accept** (Accetta). Se i dati dei capillari non soddisfano i requisiti di cui sopra, fare clic su **Reject** (Rifiuta) e consultare la sezione "Risoluzione dei problemi di calibrazione spettrale" della *Guida per l'utente per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer*.

## Preparazione dei campioni

1. Prima di aprire le provette, agitare su vortex e poi centrifugare brevemente per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.
2. Preparare una miscela di formammide e dimensioni standard del DNA secondo le informazioni contenute nella Tabella 14, pagina accanto.
3. Agitare su vortex la miscela e centrifugarla brevemente.
4. Ripartire 12 µL di miscela in ogni provetta per ogni campione da analizzare.
5. Aggiungere 1 µL di prodotto PCR o ladder allelico (diluito, se necessario).
6. Denaturare per 3 minuti a 95 °C.
7. Congelare istantaneamente collocando la piastra su ghiaccio per 3 min.

In alternativa, per raffreddare la piastra è anche possibile usare un termociclatore regolato su 4 °C.

8. Caricare i campioni sul vassoio.

**Tabella 14. Preparazione di una miscela di formammine e DNA size standard**

| Componente                     | Volume per campione (µL) |
|--------------------------------|--------------------------|
| Hi-Di Formamide                | 12,0                     |
| DNA Size Standard 24plex (BTO) | 0,5                      |

**Nota:** poiché le iniezioni vengono eseguite contemporaneamente su tutti i capillari, occorre pipettare almeno 1 colonna intera (protocollo da 8 campioni) o 3 colonne intere (protocollo da 24 campioni) sulla piastra degli analizzatori multicapillari. Se si analizza un numero inferiore di campioni, le posizioni vuote devono essere riempite con 12 µL di Hi-Di Formamide.

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

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

**Importante:** l'effettiva temperatura dell'ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti per PCR usati negli strumenti multicapillari, perciò si possono avere picchi con spalla (shoulder peaks) o picchi divisi, specie a basse temperature. **Verificare che le condizioni dell'ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento.** Inoltre, accertarsi che i tamponi siano equilibrati alle condizioni dell'ambiente.

## Configurazione di un processo

In caso di impiego di un Investigator 24plex GO! Kit su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer per la prima volta, è necessario impostare innanzitutto un numero di protocolli:

- Instrument Protocol (Protocollo strumento)
- Size Standard (Dimensioni standard)
- QC Protocol (Protocollo QC)

- Assay (Esame)

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

## Instrument Protocol (Protocollo strumento)

1. Configurare Instrument Protocol (Protocollo strumento) selezionando **Library** (Libreria) in **Analyze** (Analizza). Quindi andare a **Instrument Protocols** (Protocolli strumento) e fare clic su **Create** (Crea).

**Nota:** modificare le impostazioni predefinite del modulo di processo da "HID36\_POP4", come mostrato nella Tabella 15, pagina accanto.

2. È necessario inserire o selezionare i parametri dalla Tabella 15.
3. Fare clic su **Save** (Salva) per confermare le modifiche.

Riservato



**Tabella 15. Parametri protocollo strumento per Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer**

| Parametro                                   | Impostazione 3500               | Impostazione 3500xL             |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Application Type (Tipo di applicazione)     | HID                             | HID                             |
| Capillary Length (Lunghezza del capillare)  | 36 cm                           | 36 cm                           |
| Polymer (Polimero)                          | POP4                            | POP4                            |
| Dye Set (Set di coloranti)                  | ad esempio, BT6                 | ad esempio, BT6                 |
| Run Module (Modulo processo)                | HID36_POP4                      | HID36_POP4                      |
| Protocol Name (Nome protocollo)             | ad esempio, Investigator 24plex | ad esempio, Investigator 24plex |
| Oven Temperature (Temperatura forno) (°C)   | Valore predefinito (60)         | Valore predefinito (60)         |
| Run Voltage (Tensione processo) (kV)        | 13,0                            | 13,0                            |
| PreRun Voltage (Tensione pre-processo) (kV) | Valore predefinito (15)         | Valore predefinito (15)         |
| Injection Voltage (Tensione iniezione) (kV) | 1,2                             | 1,6                             |
| Run Time (Durata processo) (s)              | 1550                            | 1550                            |
| PreRun Time (Durata pre-processo) (s)       | Valore predefinito (180)        | Valore predefinito (180)        |
| Injection Time (Durata iniezione) (s)       | 30,0*                           | 33,0*                           |
| Data Delay (Ritardo dati) (s)               | Valore predefinito (1)          | Valore predefinito (1)          |
| Advanced Options (Opzioni avanzate)         | Valore predefinito              | Valore predefinito              |

\* Deviando dalle impostazioni standard, la durata dell'iniezione può variare da 1 a 35 s a seconda del tipo di campione. Se sono registrati campioni con intensità altissima del segnale, si può selezionare una durata d'iniezione più breve. Per i campioni a basso tenore di DNA, può essere necessario una durata d'iniezione fino a 35 s.

## Size Standard (Dimensioni standard)

1. Per configurare Size Standard (Dimensioni standard), selezionare **Library** (Libreria) in **Analyze** (Analizza). Quindi andare a **Size Standards** (Dimensioni standard) e fare clic su **Create** (Crea).
2. È necessario inserire o selezionare i parametri della Tabella 16, pagina seguente.

Utilizzare il DNA Size Standard 24plex (BTO) con frammenti delle seguenti lunghezze: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 e 550 bp.

- In alternativa, importare i parametri del DNA Size Standard 24plex (BTO) usando il file modello Investigator raccomandato "SST-BTO\_60-500bp" (Tabella 21, pagina 47).
- Fare clic su **Save** (Salva) per confermare le modifiche.

**Tabella 16. Parametri dimensioni standard**

| Parametro                           | Impostazione                 |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Size Standard (Dimensioni standard) | ad esempio, SST-BTO_60-500bp |
| Dye Color (Tinta del colorante)     | Orange (Arancione)           |

## QC Protocol (Protocollo QC)

- Per configurare QC Protocol (Protocollo QC), selezionare **Library** (Libreria) in **Analyze** (Analizza). Quindi andare a **QC Protocols** (Protocolli QC) e fare clic su **Create** (Crea).
- È necessario inserire o selezionare i parametri della Tabella 17.

**Tabella 17. Parametri protocollo QC**

| Parametro                           | Impostazione        |
|-------------------------------------|---------------------|
| Protocol Name (Nome protocollo)     | ad esempio, BTO_550 |
| Size Standard (Dimensioni standard) | SST-BTO_60-500bp    |
| Sizecaller                          | SizeCaller v1.1.0   |

- Entrare in **Analysis Settings** (Impostazioni analisi), selezionare **Peak Amplitude Threshold** (Soglia di ampiezza picchi) e assicurarsi che tutti i colori siano abilitati.

Verificare le impostazioni consigliate per le analisi nella Tabella 20, pagina 45. Tutte le altre impostazioni devono rimanere quelle **predefinite**.

- Fare clic su **Save** (Salva) per confermare le modifiche.

## Assay (Esame)

1. Per impostare un Assay (Esame), andare a **Library** (Libreria) in **Manage** (Gestisci). Quindi andare a **Assays** (Esami) e fare clic su **Create** (Crea).
2. Per analizzare i frammenti dell'Investigator 24plex è necessario selezionare i parametri mostrati nella Tabella 18, qui sotto.
3. Fare clic su **Save** (Salva) per confermare le modifiche.

Tabella 18. Parametri esame

| Parametro                                  | Impostazione                    |
|--|---------------------------------|
| Assay Name (Nome esame)                    | ad esempio, Investigator 24plex |
| Color (Colore)                             | Valore predefinito              |
| Application Type (Tipo di applicazione)    | HID                             |
| Instrument Protocol (Protocollo strumento) | ad esempio, Investigator 24plex |
| QC Protocols (Protocolli QC)               | ad esempio, BTO_550             |

## Avvio del processo

1. Sulla dashboard, fare clic su **Create New Plate** (Crea nuova piastra).
2. Andare a **Setup** (Configura) e quindi a **Define Plate Properties** (Definisci proprietà piastra) e selezionare **Plate Details** (Dettagli piastra). Selezionare o inserire i parametri nella Tabella 19.

Tabella 19. Proprietà piastra

| Proprietà                                  | Impostazione                    |
|--|---------------------------------|
| Name (Nome)                                | ad esempio, Investigator 24plex |
| Number of Wells (Numero di pozzetti)       | 96                              |
| Plate Type (Tipo di piastra)               | HID                             |
| Capillary Length (Lunghezza del capillare) | 36 cm                           |
| Polymer (Polimero)                         | POP4                            |

3. Fare clic su **Assign Plate Contents** (Assegna contenuti piastra) per confermare le modifiche.
4. Inserire il nome campione stabilito in ciascun pozzetto contenente un campione o un ladder allelico. Questo consentirà di identificare la posizione nel pozzetto di ciascun campione ai fini della raccolta e dell'elaborazione dei dati.
5. Alla voce **Assay** (Esame), scegliere l'esame corretto per l'analisi. Se sono stati seguiti i passaggi indicati in "Configurazione di un processo", fare clic su **Add from Library** (Aggiungi da libreria) e selezionare **Investigator 24plex** come Instrument Protocol (Protocollo strumento). Tutti i pozzetti a cui è stato assegnato un nome sulla piastra dovranno essere associati a un esame.
6. Ripetere per **File name conventions** (Convenzioni per i nomi dei file) e Results group (Gruppo risultati).
7. Selezionare i pozzetti per i quali deve essere specificato un esame. Selezionare le caselle accanto ai nomi di **Assay** (Esame), **File name conventions** (Convenzioni per i nomi dei file) e **Results group** (Gruppo risultati) per assegnarli ai pozzetti selezionati.
8. Qualora non si sia già proceduto, caricare la piastra assemblata nello strumento e chiudere lo sportello dello strumento per reinizializzarlo. Successivamente fare clic su **Link Plate for Run** (Collega piastra per il processo). Nella schermata successiva, inserire il Run Name (Nome processo) desiderato e fare clic su **Start Run** (Avvia processo).

## Parametri dell'analisi/metodo dell'analisi

La Tabella 20, pagina accanto elenca i parametri raccomandati per l'analisi nel foglio di lavoro Peak Detector (Rilevatore picchi).

**Tabella 20. Impostazioni raccomandate per gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer**

| Parametro  | Impostazioni  |
|--|---|
| Peak Detection Algorithm (Algoritmo rilevamento picchi)                          | Advanced (Avanzato)   |
| Ranges (Range)   | Analyses (Analisi): Partial Range<br>Start Point (Punto d'inizio range parziale): 1000;<br>Stop Point (Punto di arresto): 20.000<br>Sizing (Dimensionamento): All Sizes (Tutte le dimensioni)   |
| Smoothing and Baseline (Levigatura e comparazione dei dati al punto di partenza) | Smoothing (Levigatura): Light (Leggera)<br>Baseline Window (Finestra di baseline): 51 pts   |
| Size Calling Method (Metodo di assegnazione dimensioni)                          | Local Southern Method (Metodo meridionale locale)   |
| Peak Detection (Rilevamento picchi)  | Peak Amplitude Thresholds (Soglie di ampiezza picchi)<br>B:* Y:*<br>G:* R:*<br>P:* O:*<br>Min. Peak Half Width (Semilarghezza del picco min.): 2 pts<br>Polynomial Degree (Grado del polinomio): 3<br>Peak Window Size (Misura della finestra del picco): 11 pts†<br>Slope Thresholds (Soglie di pendenza): 0,0 |

\* La soglia di ampiezza picchi (valore di cutoff) corrisponde all'altezza minimo di picco che sarà filtrata dal GeneMapper ID-X Software. Le soglie sono solitamente di 50–200 RFU e dovrebbero essere determinate individualmente dal laboratorio.

Raccomandazione: L'altezza minima del picco dovrebbe essere 3 volte più elevata del rumore di fondo della baseline.

† Solo l'impostazione della misura della finestra del picco è diversa dai valori predefiniti di Applied Biosystems per l'analisi HID.

# Protocollo: analisi

Per istruzioni generali sull'analisi automatica di campioni, consultare la Guida per l'utente appropriata del GeneMapper ID-X Software.

L'individuazione della lunghezza esatta dei prodotti amplificati dipende dal tipo di apparecchio, dalle condizioni dell'elettroforesi e dalle dimensioni standard DNA usate. A causa della complessità di alcuni loci, la determinazione della taglia dovrebbe essere basata su una distribuzione uniforme dei riferimenti. Utilizzare il DNA Size Standard 24plex (BTO) con frammenti delle seguenti lunghezze: 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 e 550 bp.

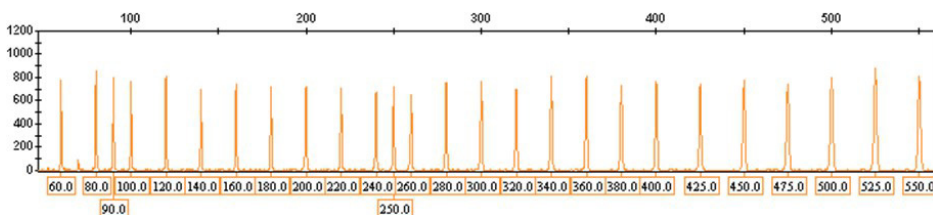


Figura 4. Elettroferogramma dei frammenti di DNA Size Standard 24plex (BTO), lunghezze in bp.

## Software di analisi

L'allocazione degli alleli deve essere effettuata utilizzando un software di analisi idoneo (ad esempio, GeneMapper ID-X Software in combinazione con i file template di Investigator, disponibili per il download da [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com); vedere la Tabella 21, accanto).

**Tabella 21. File template Investigator raccomandati per GeneMapper ID-X**

| <b>Tipo di file</b>                        | <b>Nome del file</b>     |
|--|--------------------------|
| Panels (Pannelli)                          | 24plex_Panels_x          |
| BinSets                                    | 24plex_Bins_x            |
| Stutter                                    | 24plex_Stutter_x         |
| Size standard (Dimensioni standard)        | SST-BTO_60–500bp         |
| Analysis Method (Metodo di analisi)        | Analysis_HID_3500_200rfu |
| Plot Settings (Impostazioni per i grafici) | Plots_6dyes              |

Usare sempre Pannelli e BinSets; gli altri file modello sono facoltativi.

## Controlli

Gli alleli elencati nella Tabella 22 rappresentano il Control DNA 9948 (incluso nell'Investigator 24plex GO! Kit) e il DNA di altre linee cellulari standard disponibili in commercio.

Riservato

**Tabella 22. Assegnazione degli alleli dell'Investigator 24plex GO! Kit**

| Loco        | CCR 9948  | CCR 9947A | CCR 3657  |
|-------------|-----------|-----------|-----------|
| Amelogenina | 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     |
| 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     |



Per un'ulteriore conferma, la Tabella 22 mostra gli alleli del DNA di riferimento acquistati da Coriell Cell Repositories (CCR) e 2 DNA di riferimento acquistati da CCR secondo lo standard di Szibor et al. (2).

## Sensore di qualità

L'Investigator 24plex GO! Kit contiene 2 controlli interni per PCR (i sensori di qualità QS1 e QS2), che forniscono informazioni utili sull'efficienza di amplificazione della PCR in generale e sulla presenza di inibitori della PCR. I sensori di qualità interni sono inclusi nella miscela di primer e amplificati contemporaneamente con i marker STR polimorfici. I sensori di qualità sono marcati con BTP e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2).

Per affrontare il problema della similarità della sequenza e la possibilità di un legame non specifico, è stato progettato uno stampo di DNA sintetico del controllo interno utilizzando un algoritmo casuale. La sequenza dello stampo differisce da tutte le sequenze di DNA note e, in particolare, non ha alcuna somiglianza con il DNA umano. La possibilità di un legame non specifico nell'ambito di una reazione di amplificazione della PCR multiplex è quindi molto bassa.

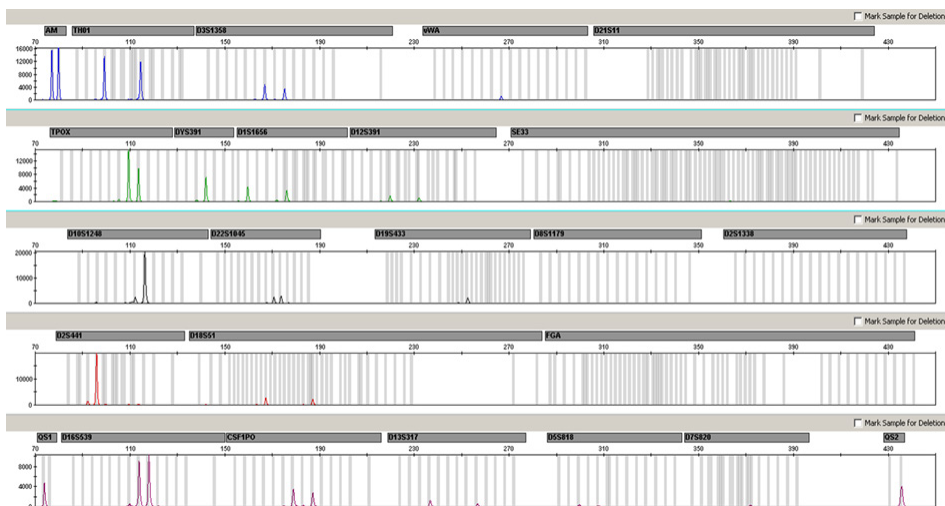
In generale, il successo dell'amplificazione del sensore di qualità piccolo (QS1) indica che la PCR è stata impostata e condotta correttamente, indipendentemente dal fatto che il DNA fosse presente o assente nel campione. Se nell'analisi dei prodotti dell'amplificazione non viene rilevato nessun sensore di qualità, significa che il pipettaggio della configurazione della PCR o la PCR stessa è stata eseguita in modo errato. Questo indica che l'esperimento deve essere ripetuto seguendo attentamente le istruzioni indicate nel protocollo.

Esperimenti di sensibilità hanno rivelato che i controlli interni non hanno alcun effetto sulle prestazioni della PCR. L'amplificazione di basse quantità di DNA stampo ha mostrato risultati simili per le miscele di primer con o senza i sensori di qualità.

Inoltre, l'analisi dei 2 frammenti di controllo interno, QS1 e QS2, e dei prodotti dell'amplificazione del target STR consente l'identificazione differenziale della presenza di inibitori o di degradazione del DNA in una reazione di amplificazione.

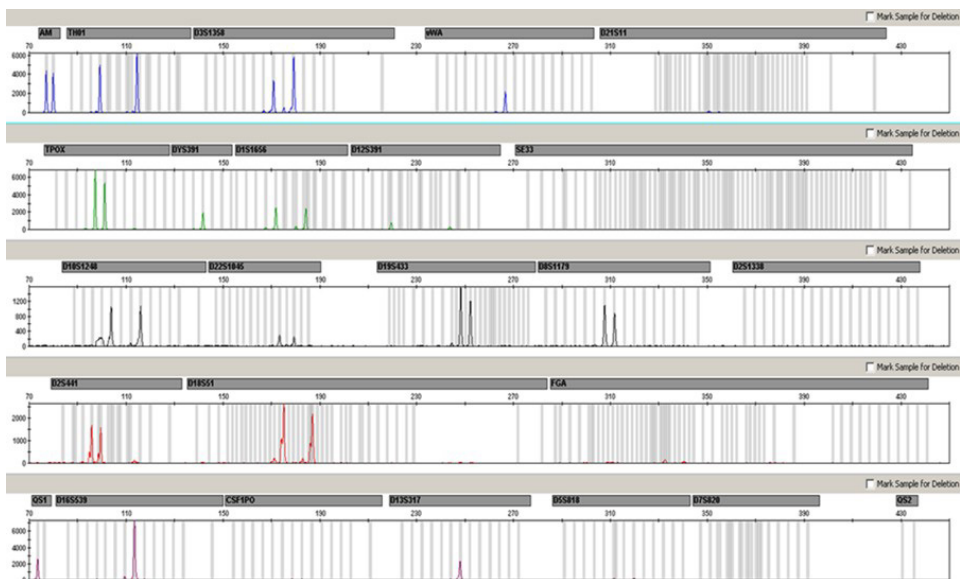
In caso di degradazione del campione, l'amplificazione di frammenti target più piccoli è più efficiente di quella di frammenti target più grandi. Tuttavia, la degradazione dello stampo target non ostacola l'amplificazione dei frammenti di controllo interno dallo stampo del controllo interno (Elettroferogramma dell'analisi STR in presenza di DNA degradato (frammenti di 150 bp). Il DNA genomico è stato tranciato in frammenti di 150 bp mediante ultrasuoni. I frammenti STR di grandi dimensioni sono stati amplificati con una resa della PCR molto bassa, ma QS1 e QS2 sono stati amplificati normalmente con picchi di pari altezza. I marcatori sono visualizzati nella parte alta dell'elettroferogramma. I sensori di qualità sono marcati con BTP (pannello 5) e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2).). Pertanto, un rapporto uguale di QS1 e QS2, insieme a un rapporto a favore di piccoli prodotti di bersaglio STR, suggerisce una degradazione del campione.

Riservato



**Figura 5. Elettroferogramma dell'analisi STR in presenza di DNA degradato (frammenti di 150 bp).** Il DNA genomico è stato tranciato in frammenti di 150 bp mediante ultrasuoni. I frammenti STR di grandi dimensioni sono stati amplificati con una resa della PCR molto bassa, ma QS1 e QS2 sono stati amplificati normalmente con picchi di pari altezza. I marcatori sono visualizzati nella parte alta dell'elettroferogramma. I sensori di qualità sono marcati con BTP (pannello 5) e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2).

Se inibitori come l'ematina sono presenti nel campione in alte concentrazioni, l'amplificazione è meno efficiente e i frammenti di DNA più grandi sono amplificati peggio di quelli più piccoli. Se l'analisi dei prodotti di amplificazione indica un'amplificazione inefficiente delle sequenze bersaglio STR più grandi e del frammento più grande del sensore di qualità (QS2), mentre il sensore di qualità più piccolo (QS1) viene amplificato correttamente, è probabile che il campione sia stato contaminato da inibitori. Ciò significa che uno spostamento del rapporto a favore del sensore di qualità piccolo (QS1) suggerisce la presenza di inibitori (Figura 6).



**Figura 6. Elettroferogramma dell'analisi degli STR in presenza di ematina.** Ventidue marcatori STR, amelogenina e i 2 sensori di qualità sono stati amplificati in presenza di 1000  $\mu\text{M}$  di ematina e analizzati mediante elettroforesi capillare. L'amplificazione di frammenti ad alto peso molecolare, compresi i marcatori STR superiori a 250 bp e QS2, è stata inibita dall'elevato contenuto di ematina. I marcatori sono visualizzati nella parte alta dell'elettroferogramma. I sensori di qualità sono marcati con BTP (pannello 5) e appaiono in frammenti della dimensione di 74 bp (QS1) e 435 bp (QS2, non visibile).

L'analisi della presenza dei 2 sensori di qualità permette all'utente di identificare in modo differenziato la presenza di inibitori della PCR o il verificarsi di una degradazione nel campione forense. Ciò fornisce all'utente informazioni utili per l'interpretazione dei dati e per la pianificazione delle fasi successive.

La Tabella 23, pagina accanto, riepiloga i possibili aspetti dei profili e i loro significati.

**Tabella 23. Aspetti dei profili e loro significato**

| Picchi degli alleli | QS1      | QS2       | Interpretazione       |
|---------------------|----------|-----------|-----------------------|
| Presente            | Presente | Presente  | Profilo riuscito      |
| Assente             | Presente | Presente  | Assenza di DNA        |
| Assente             | Assente  | Assente   | PCR non riuscita      |
| Profilo in discesa  | Presente | Riduzione | Presenza di inibitori |
| Profilo in discesa  | Presente | Presente  | DNA degradato         |

**Nota:** i reagenti di amplificazione per entrambi i sensori di qualità sono limitati nella reazione di amplificazione di Investigator 24plex GO!, il che significa che l'altezza massima di picco è già raggiunta con 25 cicli. Pertanto, aumentando il numero di cicli fino, ad esempio, a 26 o 27 non aumenterà l'altezza del picco dei sensori di qualità.

Le altezze dei picchi di QS1 e QS2 possono variare leggermente tra diversi esperimenti. Una leggera dispersione dell'altezza del picco è normale e non dipende dall'influenza dell'inibitore. Durante la convalida, l'analista deve valutare il normale spettro di variazione in relazione al suo tipo di campione e deve definire un intervallo di altezza di picco regolare per entrambi i QS.

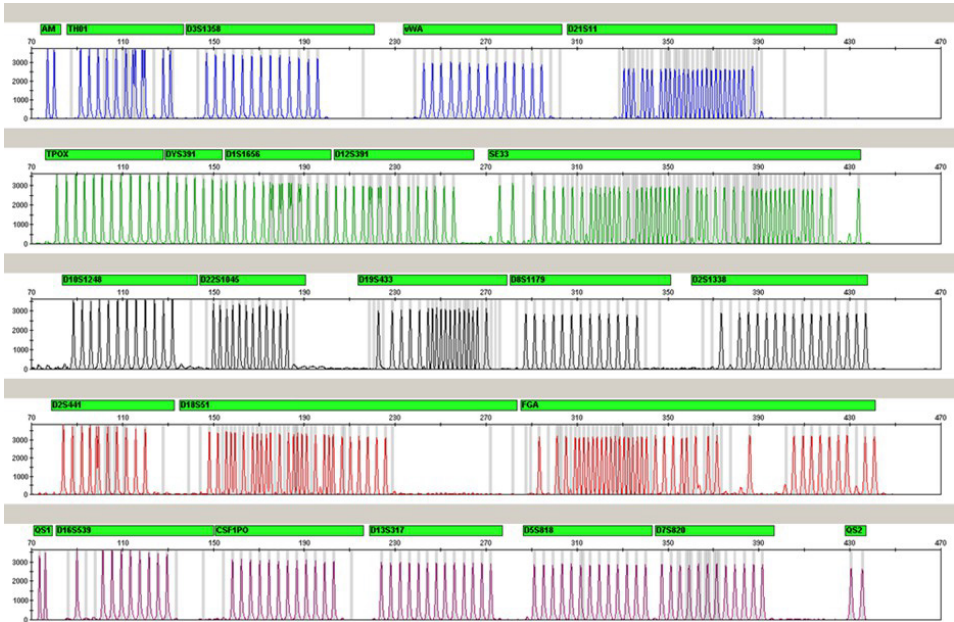
Una riduzione del segnale QS2 al di sotto del 20% del segnale QS1 indica l'inibizione della reazione della PCR.

## Alleli

La Tabella 24 mostra gli alleli del ladder allelico. Tutte le analisi sono state eseguite usando il polimero POP-4 (Tabella 24, pagina 55 e Figura 7, pagina seguente). Con strumenti per analisi, dimensioni standard DNA o polimeri differenti, la lunghezza dei frammenti può risultare diversa. Si raccomanda inoltre un allineamento visivo con il ladder allelico.

## Scala

- Orizzontale: 70–470 bp
- Verticale: secondo l'intensità del segnale



**Figura 7. Elettroferogramma del ladder allelico 24plex analizzato su uno strumento Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.** Il ladder allelico include 2 alleli per ciascun sensore di qualità (QS1 e QS2). In questo modo è possibile identificare automaticamente i picchi QS per l'analisi del campione.

**Tabella 24. Frammenti di ladder allelico inclusi nel ladder allelico 24plex**

| Loco        | Marcatore colorante | Numeri ripetuti di ladder allelico  |
|-------------|---------------------|---|
| 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  |
| 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  |
| 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  |

**Tabella 24. Frammenti di ladder allelico inclusi nel ladder allelico 24plex (continua)**

| <b>Loco</b> | <b>Marcatore colorante</b> | <b>Numeri ripetuti di ladder allelico</b>      |
|-------------|----------------------------|--|
| 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   |

Per informazioni sulle microvarianti non contenute nel ladder allelico dell'Investigator 24plex, consultare il sito web del National Institute of Standards and Technology (NIST) ([www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/)).

Riservato



# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli esperti addetti ai servizi tecnici QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni e/o i protocolli presenti in questo manuale, (per informazioni di contatto, visitare il sito [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com)).

## Commenti e suggerimenti

### Molti campioni mostrano alleli fuori scala

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Numero di cicli PCR troppo alto | Determinare il numero di cicli ottimale processando una serie rappresentativa di campioni. Reiniettare i campioni fuori scala che si verificano in condizioni di ciclo ottimali utilizzando un tempo di iniezione ridotto. |
|---------------------------------|--|

### Molti campioni mostrano segnali deboli o assenti

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Numero di cicli PCR troppo basso | Determinare il numero di cicli ottimale processando una serie rappresentativa di campioni. |
|----------------------------------|--|

### Profili non equilibrati, segnali bassi

- |   |   |
|---|---|
| a. Volume non corretto di Fast Reaction Mix 2.0 o di miscela di primer        | Controllare l'impostazione della reazione e ripetere l'amplificazione.  |
| b. La miscela master non è stata agitata al vortex prima della distribuzione. | Agitare bene la miscela master al vortex e poi centrifugare brevemente. |
| c. Dimensione del campione troppo grande                                      | Non utilizzare più di un punch da 1,2 mm o punch di diametro maggiore.  |

### Dominanza dei picchi del sensore di qualità

|  |   |
|--|---|
| I picchi QS1 e QS2 sono troppo dominanti | Utilizzando il software GeneMapper ID-X, alla voce "Display Settings" (Impostazioni di visualizzazione) selezionare una nuova impostazione per "All-dye range" (Range tutti i coloranti) per ingrandire la visualizzazione. Il range deve essere compreso tra QS1 e QS2.<br><b>Importante:</b> inoltre in "Analysis Method Editor" (Editor metodo di analisi), alla voce "Peak detector" (rilevatore picchi) regolare l'individuazione della dimensione per Ranges (Range) e Sizing (Dimensionamento) su 75 -> 450. |
|--|---|

## Commenti e suggerimenti

### Altezze di picco di QS1 e/o QS2 a discesa negli esperimenti standard

|  |  |
|--|--|
| Riduzione dell'altezza dei picchi di QS1 e QS2 | <p>Una leggera dispersione dell'altezza del picco è normale e non dipende dall'influenza dell'inibitore. Durante la convalida, l'analista deve valutare il normale spettro di variazione in relazione al suo tipo di campione e deve definire un intervallo di altezza di picco regolare per entrambi i QS.</p> <p>Una riduzione del segnale QS2 al di sotto del 20% del segnale QS1 indica l'inibizione della reazione della PCR.</p> |
|--|--|

### I campioni da tampone mostrano un segnale basso per marcatori ad alto peso molecolare

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| Lisi incompleta | Eseguire la lisi facoltativa a 95 °C. |
|-----------------|---------------------------------------|

### Altezze dei picchi di Size Standard (Dimensioni standard) troppo basse

|  |  |
|--|--|
| Sensibilità dello strumento e competizione con il campione | Se le altezze dei picchi di Size Standard (Dimensioni standard) scendono regolarmente al di sotto di 50 RFU o del valore di soglia analitica del laboratorio a causa di una maggiore competizione da parte di campioni altamente amplificati o a causa della bassa sensibilità dello strumento CE, è possibile utilizzare fino al doppio della quantità di DNA Size Standard 24plex (BTO), ossia 1 µL di Size Standard per 1 µL di HiDi. |
|--|--|

### Matrice/calibrazione spettrale non appropriate

|  |   |
|--|---|
| Con l'attuale matrice/calibrazione spettrale sono presenti picchi pull-up tra i pannelli dei coloranti (B, G, Y, R, P, O). | Questa matrice non può essere utilizzata per l'analisi. Ripetere la generazione della matrice/la calibrazione spettrale. Accertarsi di seguire scrupolosamente il protocollo corretto per lo strumento d'analisi specifico. |
|--|---|

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

|  |   |
|--|---|
| a. Il DNA Size Standard 24plex (BTO) non è stato definito o identificato correttamente | <p>Fare clic sull'icona rossa "Size Match Editor" (Editor corrispondenza dimensioni) nella barra degli strumenti superiore del software GeneMapper ID o GeneMapper ID-X. Contrassegnare i frammenti arancioni di tutti i campioni.</p> <p>Usare sempre il DNA Size Standard 24plex incluso negli Investigator Human Identification PCR Kit.</p> |
|--|---|

## Commenti e suggerimenti

- |    |   |  |
|----|---|--|
| b. | Le intensità dei segnali sono troppo alte. Se l'altezza dei picchi dei campioni è al di fuori del range di rilevamento lineare (>5000 RFU usando gli strumenti Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers), possono aumentare le stutter, i picchi divisi e gli artefatti | Ridurre la durata d'iniezione in incrementi minimi di 1 s, ridurre la quantità del prodotto di amplificazione PCR per l'analisi, o ridurre la quantità di DNA per PCR.   |
| c. | La presenza di bolle nel capillare causa picchi pull-up in tutti i pannelli cromatici ("spike") che causano un misnumero allelico   | Ripetere l'elettroforesi per confermare i risultati. Controllare il numero massimo di iniezioni raccomandate dal produttore dello strumento. Se necessario, impostare una nuova serie di capillari.  |
| d. | Le differenze di prestazioni tra i capillari di un analizzatore multicapillare possono causare uno spostamento nell'assegnazione degli alleli   | Per l'affidabilità di assegnazione degli alleli sugli analizzatori multicapillari, vanno eseguiti vari cicli di ladder allelici.   |
| e. | La bassa temperatura dell'aria dell'ambiente o dei tamponi CE può provocare spostamenti con migrazione dei frammenti o picchi di OL   | Verificare che le condizioni ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento. Assicurarsi che i tamponi siano equilibrati alle condizioni ambientali. Si consiglia di preriscaldare lo strumento CE (circa 30 min), come indicato dal produttore. |

## Iniezione/file del ladder allelico non appropriati

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a. | Si può identificare un segnale addizionale come picco del ladder allelico a causa di disfunzioni durante l'elettroforesi. Se i picchi del ladder allelico sono impropriamente nominati, il ladder non può essere usato per l'analisi | Usare differenti iniezioni/file del ladder allelico e controllare i dati delle taglie analizzate dalle dimensioni standard (in bp) del ladder allelico.<br>Usare sempre il DNA Size Standard 24plex per gli Investigator Human Identification PCR Kit.                                   |
| b. | Un solo picco del ladder allelico è sotto il valore di rilevamento dei picchi (50–200 RFU) del metodo di analisi usato, e quindi non è identificato  | Il ladder allelico deve essere caricato sullo strumento analitico ad una concentrazione superiore a quella dei campioni da analizzare.<br>In alternativa, i dati del ladder allelico possono essere analizzati con un valore inferiore di rilevamento dei picchi nel software d'analisi. |

### Commenti e suggerimenti

---

- |  |   |
|--|---|
| c. Un solo picco del ladder allelico non è stato identificato perché fuori dal range di taglie (in bp) previsto dal software | Confrontare la lunghezza dei frammenti (in bp) del primo allele in un colore del ladder allelico con il colore corrispondente nelle categorie. Confrontarlo quindi con gli altri alleli.                                    |
| d. Non sono stati trovati alleli punto   | Gli alleli punto sono alleli con differenza di almeno 1 punto rispetto all'allele intero successivo. Controllare le impostazioni del metodo analitico. Ridurre a 11 punti il valore delle dimensioni della finestra picchi. |
- 

Riservato

## Riferimenti bibliografici

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.

Riservato

# Appendice A: interpretazione dei risultati

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

## Procedura generale per l'analisi

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

## Picchi pull-up

Possono comparire picchi pull-up se l'altezza dei picchi è fuori del range di rilevamento lineare (vedere "Guida alla risoluzione dei problemi", pagina 57) o se è stata applicata una matrice non corretta. Tali picchi compaiono nella posizione di picchi specifici in altri canali cromatici, di norma con minore intensità di segnale. L'altezza dei picchi non deve superare le soglie per evitare picchi pull-up.

## Picchi di stutter

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

## Aggiunta di nucleotidi indipendente dal template

A causa della sua attività di transferasi terminale, la Taq DNA polimerasi può causare una adenilazione incompleta all'estremità 3' dei frammenti di DNA amplificati. Il picco dell'artefatto è più corto di una base rispetto a quanto previsto (-1 picchi). Tutti i primer inclusi nell'Investigator 24plex GO! Kit sono progettati per ridurre al minimo questi artefatti. L'altezza di picco dell'artefatto è in correlazione alla quantità di DNA. I laboratori dovrebbero definire i propri limiti per l'analisi dei picchi.

## Artefatti

La temperatura ambiente può influire sulle prestazioni dei prodotti PCR sugli strumenti multicapillari, per cui si verificano picchi con spalla o divisi. Se compaiono picchi con spalla o divisi, si consiglia di iniettare nuovamente il campione. Verificare che le condizioni ambiente siano mantenute secondo le raccomandazioni del produttore dello strumento. Assicurarsi che i tamponi siano equilibrati alle condizioni ambientali.

Riservato

## Appendice B: Variazione di volumi PCR con l'Investigator 24plex GO! Kit

L'Investigator 24plex GO! Kit può essere usato con volumi di miscele per metà reazione (Fast Reaction Mix + miscela di primer). Si noti che, pur avendo testato con successo il volume a reazione ridotta qui descritto, i migliori tassi complessivi di successo possono essere comunque ottenuti usando i volumi per reazione intera, come raccomandato nel manuale del kit.

### Sangue o cellule orali su FTA o altra carta

Raccomandiamo l'uso di Investigator STR GO! Punch Buffer per superare la potenziale inibizione causata dalla carta. Aggiungere 2  $\mu\text{L}$  di STR GO! Punch Buffer indipendentemente dal volume di reazione finale.

### Lisati di tampone orale

Si consiglia di ridurre il volume di lisato aggiunto in base alla riduzione del volume di reazione, ad es., 1  $\mu\text{L}$  di lisato per le metà volume di reazione. Volumi iniziali più elevati possono causare l'inibizione delle amplificazioni della PCR.

Riservato



# Informazioni per gli ordini

| Prodotto   | Contenuti  | N. cat.  |
|--|--|----------|
| Investigator 24plex GO! Kit (100)                | Primer Mix, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico 24plex, DNA size standard 24plex (BTO)   | 382426   |
| Investigator 24plex GO! Kit (400)                | Primer Mix, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico 24plex, DNA size standard 24plex (BTO)   | 382428   |
| <b>Prodotti correlati</b>                        |  |          |
| Matrix Standard BT6 (50)                         | Standard matrice per 6-FAM, BTG, BTY, BTR2, BTP e BTO, per strumenti Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers   | 386224   |
| Investigator STR GO! Lysis Buffer (200)          | Tampone di lisi per 200 campioni di tampone  | 386516   |
| Investigator STR GO! Punch Buffer (1000)         | Tampone punch per 1000 campioni di cellule epiteliali su carta   | 386528   |
| Investigator STR GO! Punch Buffer (200)          | Tampone punch per 200 campioni di cellule epiteliali su carta  | 386526   |
| <b>Raccolta dei campioni</b>                     |  |          |
| OmniSwab Sterile (100)                           | 100 tamponi di raccolta sterili con testa a spazzola estraibile, utilizzati per campioni orali e salivari  | WB100035 |
| EasiCollect Plus (50)                            | 50 dispositivi per la raccolta di campioni orali: include un applicatore in schiuma per il trasferimento diretto del campione su una QIAcard FTA Indicating integrata.   | WB120472 |
| EasiCollect Buccal Collection Kit (50)           | 50 kit per la raccolta di campioni orali: Include EasiCollect (incl. codice a barre), busta per la spedizione di ritorno, busta multi-barriera, guanti in nitrile, nastro adesivo antimanomissione ed essiccante | WB120237 |
| Uni-Core Punch 1.2 mm                            | Punch manuale per una precisa rimozione dei dischetti di campione dalle schede FTA   | WB100028 |
| <b>Investigator Human Identification PCR Kit</b> |  |          |
| Investigator Quantiplex Pro Kit (200)            | Da usare su sistemi Applied Biosystems 7500 Real-Time: Quantiplex Pro Reaction Mix, Quantiplex Pro Primer Mix, Quantiplex Pro Control DNA M1, QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer                            | 387216   |

| Prodotto                                  | Contenuti   | N. cat. |
|---|---|---------|
| Investigator Quantiplex Pro FLX Kit (576) | 6 piastre ottiche a 96 pozzetti in blister singolo con Master Mix, Control DNA M1 e QuantiTect Nucleic Acid Dilution Buffer   | 387516  |
| Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200) | Da usare sui QIAGEN Rotor-Gene® Q Real-Time Systems: 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)*         | Primer Mix, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico, DNA Size Standard e acqua priva di nucleasi  | 382415  |
| Investigator 26plex QS (100)*             | Primer Mix, Fast Reaction Mix 3.0, Control DNA, ladder allelico e acqua priva di nucleasi   | 382615  |
| Investigator Argus X-12 QS (25)*          | Primer Mix, Fast Reaction Mix 2.0, Control DNA, ladder allelico, DNA Size Standard e acqua priva di nucleasi  | 383223  |
| Investigator Argus Y-28 QS (100)*         | Primer Mix, Fast Reaction Mix 3.0, Control DNA, ladder allelico, DNA Size Standard e acqua priva di nucleasi  | 383625  |

\* Sono disponibili kit di dimensioni maggiori; informazioni su richiesta.

Per le informazioni di licenza aggiornate e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

# Cronologia delle revisioni del documento

| Data    | Modifiche  |
|---------|--|
| 12/2017 | Aggiunti protocollo ottimizzato e informazioni su Bode Buccal DNA Collector (pagine 10, 14, 17–19).  |
| 11/2018 | Appendice B aggiunta.  |
| 04/2019 | Modificato il passaggio 3 e aggiunta una nota alla Tabella 2 in “Protocollo: amplificazione mediante PCR da sangue su FTA e altra carta”.  |
| 12/2020 | Aggiunta estensione finale facoltativa. Aggiornata la sezione “Informazioni per gli ordini”.   |
| 02/2021 | La Tabella 3 è suddivisa nelle Tabelle 3a e 3b; la Tabella 5 è suddivisa nelle Tabelle 5a e 5b; la Tabella 7 è suddivisa nelle Tabelle 7a e 7b e la Tabella 9 è suddivisa nelle Tabelle 9a e 9b. Aggiunti “Veriti™ 96-Well Thermal Cycler” e “ProFlex™ 96-well PCR System” nella sezione “Attrezzature e reagenti forniti dall'operatore”. |
| 04/2024 | Aggiornate le sezioni “Guida alla risoluzione dei problemi” e “Informazioni per gli ordini”. Modifiche di layout ed editing.   |

Riservato

## Contratto di licenza limitata per l'Investigator 24plex GO! Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e alle presenti Istruzioni per l'uso e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, le presenti Istruzioni per l'uso e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, Investigator®, MinElute®, QIAamplifier® (QIAGEN Group); Biometra® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (The United States Department of Health and Human Services); Applied Biosystems®, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, Hi-Di™, POP-4®, ProFlex™, Veriti™ (Thermo Fisher Scientific o le sue società affiliate). I marchi, nomi registrati, ecc., utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.

04/2024 HB-1913-009 © 2024 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Riservato

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Riservato

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Riservato

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Riservato

# Riservato