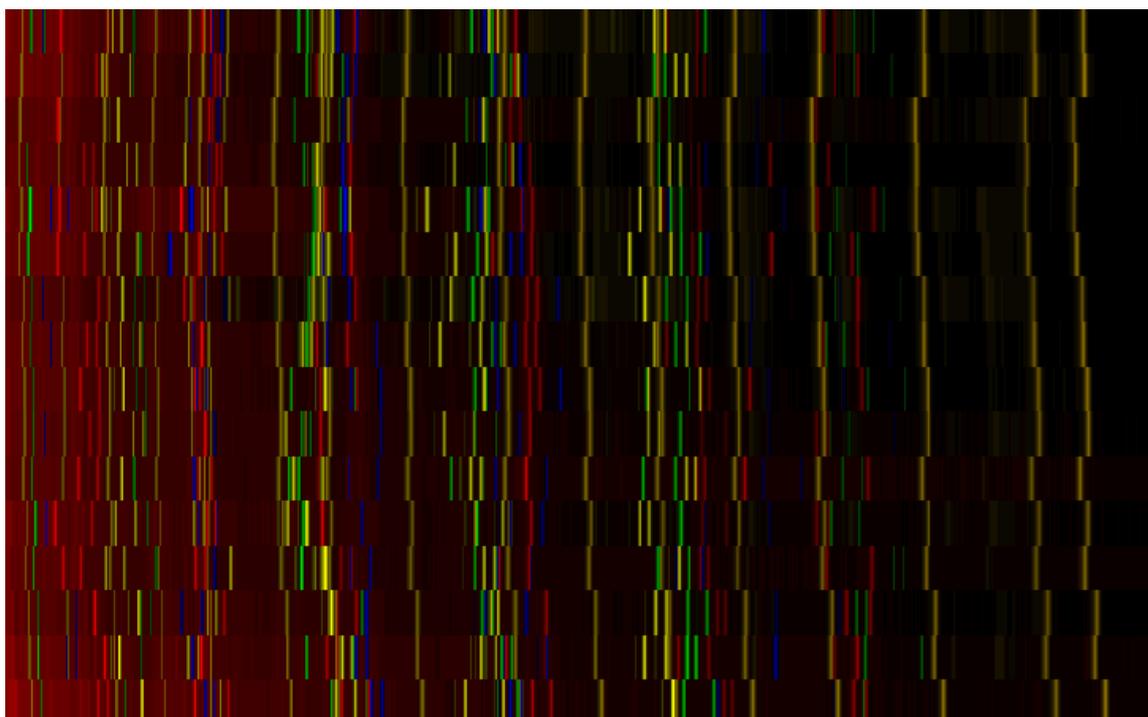


# Athos PCR Direta para Identificação Humana



*Manual do Usuário (v.2)*  
*N° do Produto MDDG0001*  
*Publicação N° MDDG0010*

## *Athos PCR Direta para Identificação Humana*

### *Índice*

|   |    |
|---|----|
| 1.Introdução .....  | 3  |
| 2.Composição do kit e Armazenamento .....                       | 8  |
| 3.Equipamentos e materiais necessários .....                    | 9  |
| 4.Reação de PCR .....   | 10 |
| 5.Eletroforese das reações em sequenciador .....                | 12 |
| Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer                |    |
| 6.Análise das amostras utilizando o GeneMapper® Software 5..... | 17 |
| 7.Validações .....  | 20 |
| 8.Troubleshooting.....  | 23 |
| 9.Segurança.....  | 24 |

## **1. Introdução**

STRs (*short tandem repeats*) são sequências repetitivas de 3 a 7 pares de bases encontradas ao longo de todo o genoma humano. Devido ao alto polimorfismo apresentado, esses marcadores têm sido utilizados como método padrão de investigação de vínculo genético, uma vez que apresentam poder de discriminação adequado para a solução da maioria dos problemas de identificação humana.

Os marcadores STRs podem ser analisados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se “primers” marcados com fluoróforos. Diferentes lócos STRs podem ser analisados simultaneamente através de reações multiplex, na qual vários pares de “primers” marcados, um para cada lóco, são usados na mesma reação. Os alelos são analisados através de eletroforese capilar e podem ser diferenciados entre si tanto pela cor emitida a partir dos fluoróforos ligados aos primers quanto pelos tamanhos dos produtos obtidos.

O Kit Athos PCR Direta para Identificação Humana consiste em um sistema que permite a coamplificação de 21 lócos de STRs autossômicos e o marcador Amelogenina em um sistema de detecção 5-dye. Além dos 13 lócos que constituem o banco de dados dos Estados Unidos (CODIS), o kit permite a análise de STRs nos lócos PentaE, D10S1237, D2S1338, D1S1656, D19S433, HUMF13B, D22S1045 e PentaD (Tabela 1).

O Kit Athos PCR Direta possui um tampão desenvolvido para que não seja necessária a adição de nenhum outro reagente na reação. Pode ser utilizado na análise de amostras de sangue ou saliva em papel filtro Whatman® Protein Saver Cards 903. Não é necessária a extração do DNA.

Ele pode ser também utilizado em amostras de DNA em solução, sendo necessário 5-10 ng de DNA para a reação.

A escada alélica específica para o Kit Athos PCR Direta foi desenvolvida contendo os principais alelos de cada lóco e acompanha o kit.

Ao Kit Athos PCR Direta também está integrado o padrão de peso molecular, Athos-512\_v2 que possui 17 fragmentos com os tamanhos de 62, 75, 92, 112, 133, 152, 183, 203, 236, 275, 307, 336, 366, 396, 443, 490 e 512 nucleotídeos. Cada fragmento é marcado com a fluorescência DYC e a curva gerada por estes fragmentos é adequada para a análise de todos os lócos de STRs do Kit Athos PCR Direta.

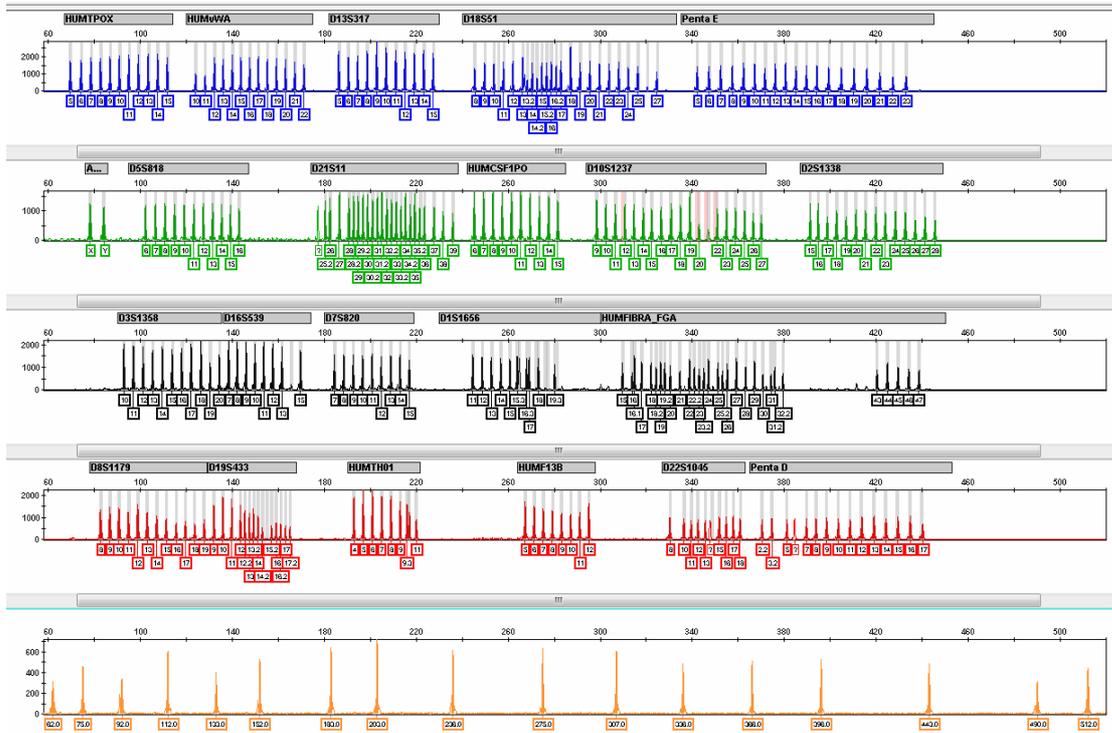
## *Athos PCR Direta para Identificação Humana*

**Tabela 1:** Descrição dos locos analisados, alelos presentes na Escada Alélica e no DNA genômico controle 002MDD do Kit Athos PCR Direta para Identificação Humana.

| Lóco         | Localização no cromossomo | Alelos presentes na Escada Alélica  | Fluorescência | Controle 002MD D |
|--------------|---------------------------|---|---------------|------------------|
| HUMTPOX      | 2p23-2per                 | 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15   | Azul          | 11, 8            |
| HUMVWA       | 12p12-pter                | 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22  | Azul          | 15, 14           |
| D13S317      | 13q22-31                  | 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15   | Azul          | 12, 11           |
| D18S51       | 18q21.3                   | 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27                                      | Azul          | 18, 13           |
| Penta E      | 15q26.2                   | 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23   | Azul          | 15, 11           |
| Amelogenina  | X: p22.1-22.3<br>Y: p11.2 | X, Y  | Verde         | XX               |
| D5S818       | 5q21-31                   | 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16  | Verde         | 13, 12           |
| D21S11       | 21q11.2-q21               | 25.2, 26, 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, 37, 38, 39                          | Verde         | 30, 29           |
| HUMCSF1PO    | 5q33.3-34                 | 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15  | Verde         | 12, 10           |
| D10S1237     | 10q25.3                   | 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27   | Verde         | 25, 23           |
| D2S1338      | 2q35-37.1                 | 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28  | Verde         | 26, 17           |
| D3S1358      | 3p21.31                   | 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20  | Amarela       | 18, 15           |
| D16S539      | 16q24-qter                | 7,8,9,10,11,12,13,15  | Amarela       | 11               |
| D7S820       | 7q21.11                   | 7,8,9,10,11,12,13,14, 15  | Amarela       | 12, 10           |
| D1S1656      | 1q42                      | 11,12,13,14,15,15.3,16, 16.3, 17, 18, 19.3  | Amarela       | 16, 15           |
| HUMFIBRA_FGA | 4q28                      | 15, 16, 16.1, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 21, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 25, 25.2, 26, 27, 28, 29, 30, 31,31.2, 32.2, 43, 44, 45, 46, 47 | Amarela       | 24               |
| D8S1179      | 8q24.13                   | 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  | Vermelha      | 13, 12           |
| D19S433      | 19q12-13.1                | 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2   | Vermelha      | 14, 12           |
| HUMTH01      | 11p15.5                   | 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11   | Vermelha      | 7, 6             |
| HUMF13B      | 1q31-32.1                 | 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12   | Vermelha      | 10               |
| D22S1045     | 22q12.3                   | 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18   | Vermelha      | 17               |
| Penta D      | 21q22.3                   | 2.2, 3.2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17  | Vermelha      | 12, 9            |

*Perfil da escada alélica*

A Figura 1 mostra o resultado da eletroforese da Escada Alélica de acordo com os procedimentos descritos na página 11.



**Figura 1** - Eletoferograma da escada alélica do Kit Athos PCR Direta gerado pelo GeneMapper® Software 5.

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

### Perfil do controle positivo 002MDD

A Figura 2 mostra o resultado da amplificação do controle positivo 002MDD do Kit Athos PCR Direta a partir de 1 disco de 1.2mm com amostra de sangue em papel filtro Whatman® Protein Saver Cards 903 de acordo com os procedimentos descritos na página 10.

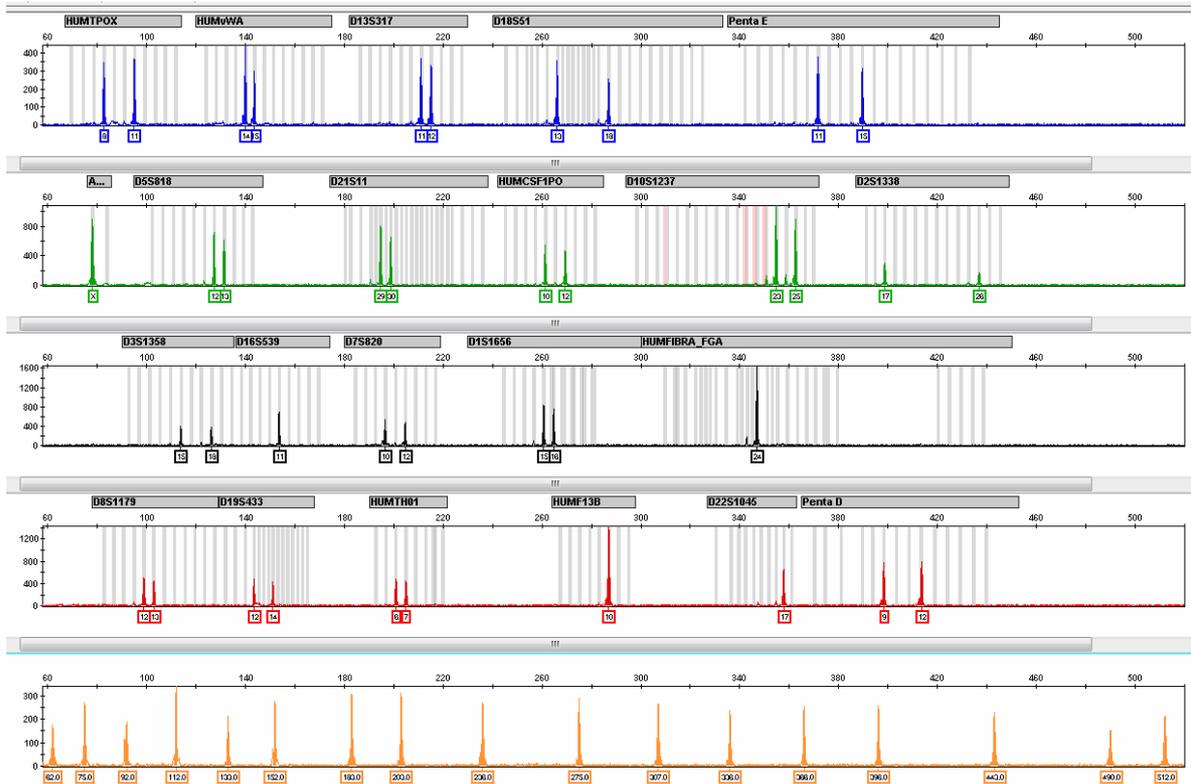


Figura 2 - Eletroferograma do Controle Positivo 002MDD do Kit Athos PCR Direta gerado pelo GeneMapper® Software 5.

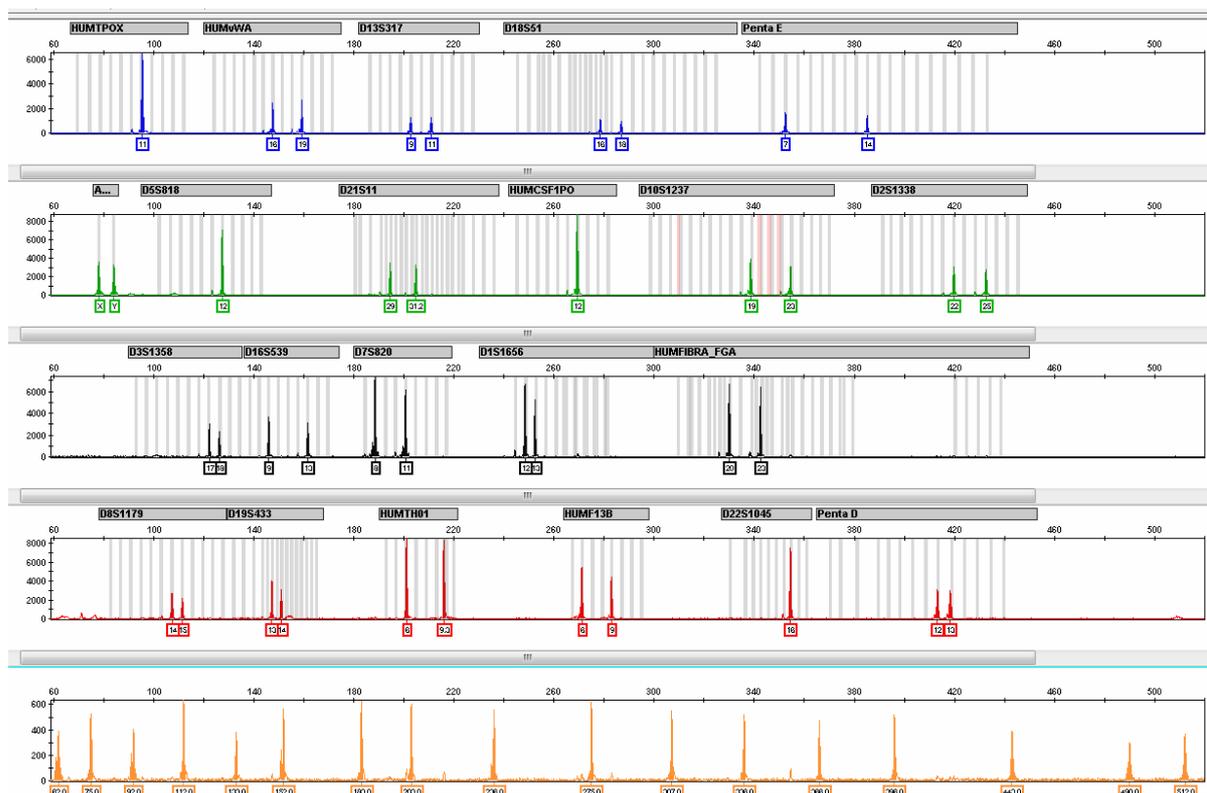


O controle positivo do kit deve ser utilizado como controle de amplificação para verificar a qualidade dos componentes e a obtenção do genótipo esperado.

*Perfil do controle 2800M*

A Figura 3 mostra o resultado da amplificação do controle 2800M com o Kit Athos PCR Direta a partir de 5 ng de DNA em solução de acordo com os procedimentos descritos na página 10.

A Tabela 2 descreve os locos analisados e os alelos esperados para o controle 2800M.



**Figura 3** - Eleetroferograma do controle positivo 2800M amplificado com o kit Athos PCR Direta gerado pelo GeneMapper® Software 5.

**Tabela 2:** Descrição dos locos analisados no sistema e dos alelos presentes no controle 2800M.

| Lóco        | 2800M    | Lóco         | 2800M  |
|-------------|----------|--------------|--------|
| HUMTPOX     | 11       | D3S1358      | 18, 17 |
| HUMVWA      | 19, 16   | D16S539      | 13, 9  |
| D13S317     | 11, 9    | D7S820       | 11, 8  |
| D18S51      | 18, 16   | D1S1656      | 13, 12 |
| Penta E     | 14, 7    | HUMFIBRA_FGA | 23, 20 |
| Amelogenina | XY       | D8S1179      | 15, 14 |
| D5S818      | 12       | D19S433      | 14, 13 |
| D21S11      | 31.2, 29 | HUMTH01      | 9.3, 6 |
| HUMCSF1PO   | 12       | HUMF13B      | 9, 6   |
| D10S1237    | 23, 19   | D22S1045     | 16     |
| D2S1338     | 25, 22   | Penta D      | 13, 12 |

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

### 2. Composição do kit e Armazenamento

#### Componentes fornecidos

Todos os reagentes necessários para a amplificação e análise dos 21 locos de STRs e do marcador Amelogenina são fornecidos com o kit em uma série de 4 tubos de pré-amplificação (caixa etiqueta verde) e 2 tubos de pós-amplificação (caixa etiqueta vermelha) (Tabela 3).

**Importante!** Os reagentes de pré-amplificação devem permanecer isolados de qualquer fonte de contaminação por DNA, especialmente de produtos de PCR amplificados anteriormente ou escadas alélicas.

Descongele completamente os reagentes antes do primeiro uso. Siga as instruções de armazenamento da Tabela 3.

O Athos Primer Mix, Athos Allelic Ladder e Athos-512\_v2 contém primers marcados com fluorescências que são sensíveis à luz. Proteja esses reagentes da luz, não deixe expostos sobre a bancada. O armazenamento dos componentes fornecidos deve seguir as recomendações específicas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Componentes do kit e suas respectivas descrições, quantidades para 100 reações e condições de armazenamento.

| Componente                | Descrição  | Volume                | Armazenamento  |
|---------------------------|--|-----------------------|--|
| Athos PCR Mix             | MgCl <sub>2</sub> , deoxinucleotídeos trifosfatos e Taq DNA polimerase em solução tampão                           | 2 tubos, 770 µL/ tubo | -15°C a -25°C, estável por 6 meses após o início do uso ou até a data de validade                                  |
| Athos Primer Mix          | Primers fluorescentes e não-fluorescentes para amplificação de 21 locos de STRs e do marcador Amelogenina          | 1 tubo, 110 µL/ tubo  | -15°C a -25°C e 2°C a 8°C após o início do uso, estável por 6 meses após o início do uso ou até a data de validade |
| Athos Escada Alélica      | Mistura de alelos amplificados. Verificar alelos presentes na Escada Alélica na Tabela 1 e Figura 1                | 1 tubo, 12µL/ tubo    |  |
| Athos DNA Controle 002MDD | DNA Controle 002MDD<br>Contém DNA humano feminino a 10 ng/µL<br>Verificar o perfil esperado na Tabela 1 e Figura 2 | 1 tubo, 0,05 mL/ tubo | -15°C a -25°C e 2°C a 8°C após o início do uso, estável por 6 meses após o início do uso ou até a data de validade |
| Athos-512_v2              | Marcador de peso molecular para eletroforese<br>Verificar o perfil esperado na Tabela 9 e Figura 4                 | 1 tubo, 40µL /tubo    | -15°C a -25°C, estável por 6 meses após o início do uso ou até a data de validade                                  |



Evite vários ciclos de congelamento/descongelamento dos componentes. Se necessário, faça alíquotas dos componentes em volumes menores, adequados à rotina.

### **3. Equipamentos e materiais necessários**

**Tabela 4:** Equipamentos e materiais necessários que não são fornecidos com o kit.

| <b>Equipamentos</b>        | <b>Materiais</b>              |
|----------------------------|-------------------------------|
| <sup>1</sup> Termociclador | Microtubos 0,2 mL             |
| Microcentrífuga            | Microtubos 0,5 mL             |
| Micropipetas               | Microtubos 1,5 mL             |
| Vortex                     | Ponteiras 10 uL e 200 uL      |
| <sup>2</sup> Sequenciador  | <sup>3</sup> Formamida Hi-Di™ |

<sup>1</sup> O kit foi otimizado com equipamentos Veriti® 96-Well Thermal Cycler - Applied Biosystem.

<sup>2</sup> Recomenda-se a utilização de sequenciador Applied Biosystems® 3130/3130x/Genetic Analyzer ou Applied Biosystems® 3500/3500xL Genetic Analyzer.

<sup>3</sup> Genetic Analysis Grade.

#### **4. Reação de PCR**

##### *Preparo do Master Mix para amostras em papel*

Recomenda-se vortexar os tubos por 5 segundos e centrifugar os tubos por 5 segundos antes do preparo do Master Mix (Tabela 5).

**Tabela 5:** Volumes necessários para o preparo do Master Mix para uma reação.

| Componente       | Volume  |
|------------------|---------|
| Athos PCR Mix    | 14,0 uL |
| Athos Primer Mix | 1,0 uL  |
| Água             | 5,0 uL  |

##### *Preparo do Master Mix para amostras de DNA em solução*

Recomenda-se vortexar os tubos por 5 segundos e centrifugar os tubos por 5 segundos antes do preparo do Master Mix (Tabela 6).

**Tabela 6:** Volumes necessários para o preparo do Master Mix para uma reação.

| Componente       | Volume  |
|------------------|---------|
| Athos PCR Mix    | 14,0 uL |
| Athos Primer Mix | 1,0 uL  |

 Evite vários ciclos de congelamento/descongelamento dos componentes. Se necessário, faça alíquotas dos componentes em volumes menores, adequados à rotina.

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

### Amostra de DNA

O Kit Athos PCR Direta foi desenvolvido com uma solução tampão que permite a amplificação do DNA a partir de amostras de sangue ou saliva em papel filtro sem a necessidade de qualquer tipo de extração prévia da amostra. Essa possibilidade resulta em uma redução no tempo de obtenção do resultado e também permite a realização das reações a partir de amostras contendo pouca quantidade de material.



Recomenda-se o uso do papel filtro Whatman® Protein Saver Cards 903.

Para amostras coletadas em papel filtro Whatman® FTA® classic, é necessário que se proceda a extração conforme instruções do fabricante.

### Preparo das reações de PCR

**Tabela 7:** Volumes necessários para cada reação de PCR.

| Componente                     | Amostra disco | Amostra DNA em solução |
|--------------------------------|---------------|------------------------|
| Master Mix                     | 20,0 uL       | 15,0 uL                |
| Disco de 1.2 mm (Ø) com sangue | 1 disco       | ---                    |
| Disco de 2 mm (Ø) com saliva   | 1 disco       | ---                    |
| Amostra (5- 10ng/uL)           | ---           | 1,0 uL                 |
| Água                           | ---           | 4,0 uL                 |

### Condições para amplificação

**Tabela 8:** Condições dos ciclos para a reação de amplificação do sistema.

| Incubação | Desnat.   | Anelamento | Extensão | Incubação | Incubação |
|-----------|-----------|------------|----------|-----------|-----------|
| 94°C      | 94°C      | 58°C       | 72°C     | 60°C      | 10°C      |
| 5 min     | 30 seg    | 90 seg     | 60 seg   | 60 min    | ∞         |
| 1 ciclo   | 30 ciclos |            |          | 1 ciclo   |           |



O kit foi otimizado com equipamentos Veriti® 96-Well Thermal Cycler - Applied Biosystem. A reação de PCR pode ser feita em diferentes termocicladores, sendo indispensável a avaliação do número de ciclos necessários para se obter um resultado satisfatório.

## **5. Eletroforese das reações em sequenciador Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer**



1. Antes de injetar as amostras nos sequenciadores ABI 3130/ 3130xl deve-se realizar a calibração do equipamento utilizando a Matrix DS-33 (Multi-Capillary DS-33 (Dye Set G5) Matrix Standard -Applied Biosystems) (6-FAM™, VIC™, NED™, PET™ e LIZ™ -para mais informações, consulte manual do equipamento).
2. O Kit Athos PCR Direta foi validado utilizando-se polímero POP-7™ e capilar de 50 cm.
3. O padrão Athos-512\_v2 deve ser aliqotado e descongelado até no máximo três vezes.
4. A escada alélica deve ser descongelada uma única vez e posteriormente mantida a 2- 8°C. Antes do uso, vortexar o tubo por 20 segundos e centrifugar rapidamente.

### *Preparo das amostras*

1. Verifique o volume necessário de Formamida Hi-Di™ e Athos-512\_v2 para preparar as amostras.

**Tabela 9:** Volumes necessários para cada amostra injetada

| Componente       | Volume  |
|------------------|---------|
| Formamida Hi-Di™ | 11,7 uL |
| Athos-512_v2     | 0,3 uL  |

2. Pipete 12 uL da mistura Formamida Hi-Di™/ Athos-512\_v2 em cada poço da placa.
3. Adicione 1,0 uL do produto de PCR ou 1,0 uL da Escada Alélica Athos por poço.
4. Sele a placa com a “septa” e centrifugue a placa a 3000 rpm por 40 segundos.
5. Desnature as amostras por 3 minutos a 95°C.
6. Incube por 3 minutos a -20°C.
7. Coloque a placa no equipamento e inicie a eletroforese.



Lembre-se sempre de considerar ao menos um poço da placa para injeção da Escada Alélica.

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

### Elaboração do protocolo de corrida para eletroforese no sequenciador Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer.

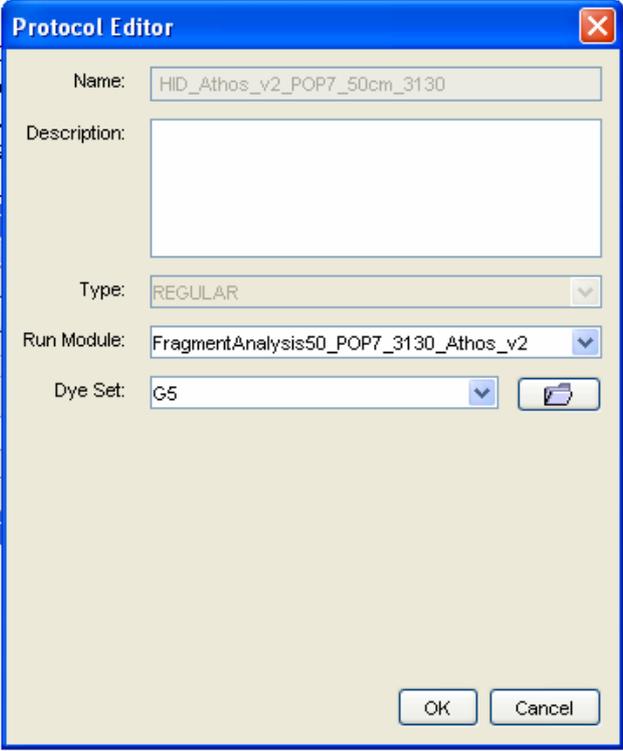
1. Abra o software do equipamento e espere o início da tela principal. Em “Module Manager”, nomeie o protocolo e insira os parâmetros conforme mostrado abaixo.

| Name                    | Value | Range              |
|-------------------------|-------|--------------------|
| Oven_Temperature        | 60    | 18...65 Deg. C     |
| Poly_Fill_Vol           | 7300  | 7300...38000 steps |
| Current_Stability       | 5.0   | 0...2000 uAmps     |
| PreRun_Voltage          | 15.0  | 0...15 kVolts      |
| Pre_Run_Time            | 180   | 1...1000 sec.      |
| Injection_Voltage       | 2.4   | 1...15 kVolts      |
| Injection_Time          | 15    | 1...600 sec.       |
| Voltage_Number_Of_Steps | 30    | 1...100 nk         |
| Voltage_Step_Interval   | 15    | 1...60 sec         |
| Data_Delay_Time         | 200   | 1...3600 sec.      |
| Run_Voltage             | 15.0  | 0...15 kVolts      |
| Run_Time                | 1600  | 300...14000 sec.   |

 Pode haver uma variação no tempo de injeção e de corrida de acordo com as condições do equipamento.

## *Athos PCR Direta para Identificação Humana*

2. Em "Protocol Manager", insira o nome e os parâmetros adequados.



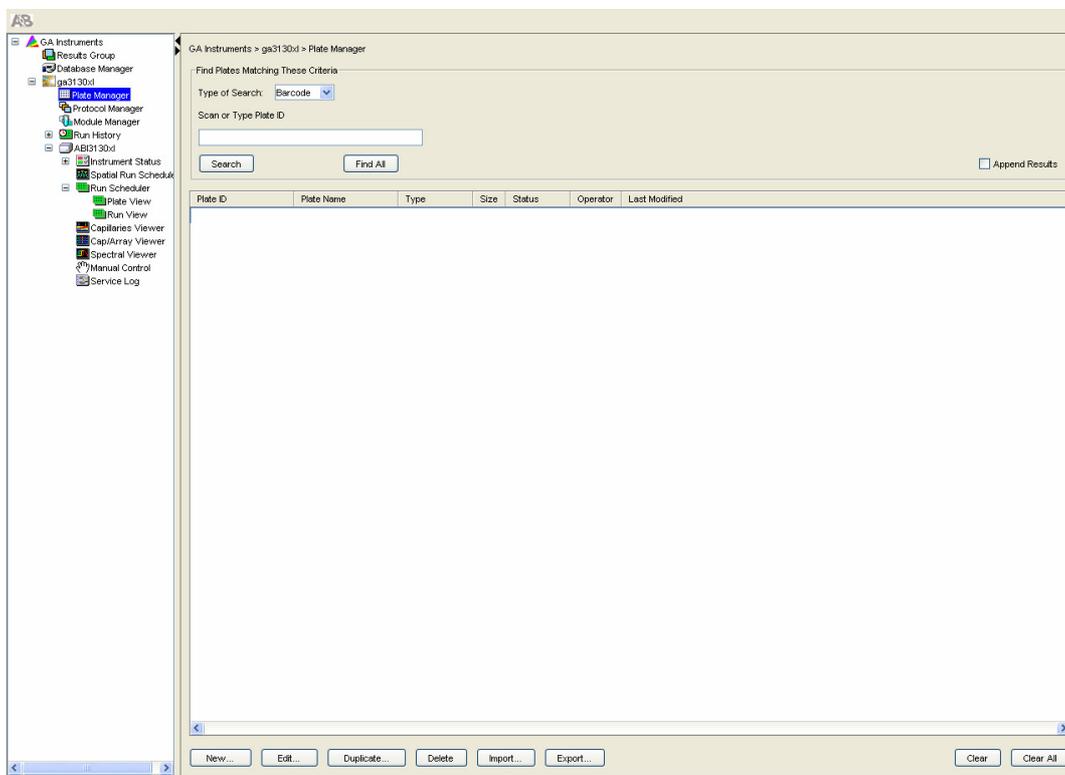
The image shows a "Protocol Editor" dialog box with the following fields and options:

- Name:** HID\_Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130
- Description:** (Empty text area)
- Type:** REGULAR
- Run Module:** FragmentAnalysis50\_POP7\_3130\_Athos\_v2
- Dye Set:** G5

Buttons: OK, Cancel

*Eletroforese dos amostras amplificadas e Escada Alélica*

1. Clique em “Plate Manager” e então em “New”.



2. Crie a planilha preenchendo os campos necessários.
  - Sample name - insira o nome das amostras;
  - Sample type - selecione “sample” para as amostras e “allelic ladder” para a escada alélica.
  - Size Standard - selecione Athos-512\_v2.
  - Panel - selecione Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130.
  - Analysis Method - HID\_Athos\_v2.
  - Results Group - crie uma pasta para armazenamento dos arquivos das corridas.
  - Instrument Protocol - HID\_Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130.
3. Clique em “OK”.
4. Selecione a planilha em “Plate view” e insira a placa em um dos compartimentos A ou B.
5. Selecione a corrida e ligue à placa.

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

GA Instruments > ga3130d > ABI3130d > Run Scheduler > Plate View

Find Plates Matching These Criteria

Type of Search: Barcode

Scan or Type Plate ID

Megaplex\_Gen2plex

Search Find All  Append Results

| Link | Plate Name        | Application | Status  | Size |
|------|-------------------|-------------|---------|------|
| B    | Megaplex_Gen2plex | GeneMapper  | pending | 96   |

A: Place a plate into plate position "A"

B: [grid]

Unlink

System Status | Plate Megaplex\_Gen2plex has been linked to Bay 1 | No Current Run

6. Clique em “run” .

## **6. Análise das amostras utilizando o GeneMapper®Software 5**

A análise dos resultados obtidos na eletroforese capilar descritas abaixo referem-se à versão do GeneMapper® Software 5. Antes de iniciar, solicite os arquivos de análise pelo email [gabriella.dna@gmail.com](mailto:gabriella.dna@gmail.com)

### *Importando o Painel e o arquivo dos “Bins”*

1. Abra o programa GeneMapper® Software 5, clique em “Tools” e posteriormente em “Panel Manager”
2. No painel de navegação, clique uma vez em “Panel Manager” e então selecione “File” e “Import Panels”.
3. Na pasta “Arquivos\_Athos\_v2” selecione “Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130\_Panels.txt” e selecione “Import”.
4. No painel de navegação, clique uma vez em “Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130\_Panels.txt”, selecione “File” e então “Import Bin Set”.
5. Na pasta “Arquivos\_Athos\_v2” selecione “Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130\_Bins.txt” e selecione “Import”.
6. Clique em “Apply” e então “OK”. A janela do “Panel Manager” fechará automaticamente.

### *Importando o método de análise HID\_Athos\_v2 para programa GeneMapper®Software 5*

1. Selecione “Tools” e então “GeneMapper Manager”.
2. Clique em “Analysis Methods”.
3. Clique em “Import” e procure na pasta “Arquivos\_Athos\_V2” o arquivo “HID\_Athos\_v2”, selecione e clique em “Import”.
4. Clique em “Done”.

## *Athos PCR Direta para Identificação Humana*

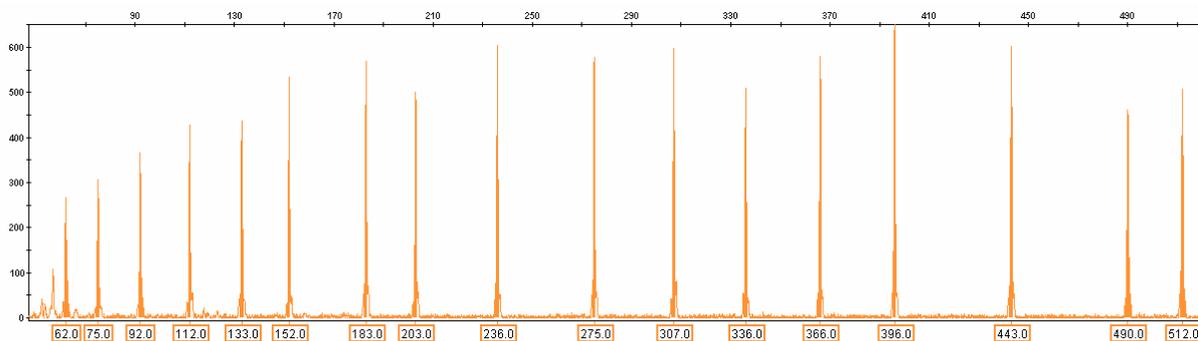
### *Importando o padrão de tamanho Athos-512\_v2 para programa GeneMapper® Software 5*

1. Selecione “Tools” e então “GeneMapper Manager”.
2. Clique em “Size Standards”.
3. Clique em “Import” e procure na pasta “Arquivos\_Athos\_v2” o arquivo Athos\_512\_v2, selecione e clique em “Import”.
4. Clique em “Done”.

**Tabela 10** - Tamanhos dos fragmentos esperados no padrão Athos-512\_v2

| Tamanhos (pb) |
|---------------|
| 62            |
| 75            |
| 92            |
| 112           |
| 133           |
| 152           |
| 183           |
| 203           |
| 236           |
| 275           |
| 307           |
| 336           |
| 366           |
| 396           |
| 443           |
| 490           |
| 512           |

A Figura 4 mostra a eletroforese do padrão de tamanho Athos-512\_v2 com os dezessete fragmentos esperados.



**Figura 4** - Eletroferograma do padrão de tamanho Athos-512\_v2 gerado pelo GeneMapper® Software 5.

## *Athos PCR Direta para Identificação Humana*

### *Analisando o resultado da eletroforese capilar*

Para mais detalhes, consulte o tutorial da *Applied Biosystems GeneMapper® ID Software Human Identification Analysis*.

1. Abra o programa GeneMapper® Software 5, clique em “File” e então “Add Samples to Project”.
  2. Selecione a pasta com os arquivos da eletroforese capilar, clique em “Add to list” e então “Add”.
  3. Na coluna “Sample Type”, selecione “Ladder”, “Sample”, “Positive Control” ou “Negative Control”. Todo projeto deve conter no mínimo um “Ladder”.
  4. Na coluna “Analysis Method” selecione o método de análise HID\_Athos\_v2.
  5. Na coluna “Panel”, selecione o painel Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130 que está dentro da pasta Athos\_v2\_POP7\_50cm\_3130\_Panels.
  6. Na coluna “Size Standard”, selecione o padrão de tamanho Athos-512\_v2.
  7. Clique no botão “Analyze” .
- 
-

## 7. Validações

### Concordância

O Kit Athos PCR Direta coamplifica 21 locos de STRs autossômicos e o marcador Amelogenina. Para validar a utilização do Kit, 100 amostras foram analisadas com o Kit Athos PCR Direta e dois kits disponíveis no mercado denominados de Kit A e Kit B.

A Figura 5 mostra a cobertura dos locos do Kit Athos PCR Direta com relação aos Kits A e B.

Houve concordância completa entre todas as amostras analisadas pelo Kit Athos PCR Direta comparadas aos Kits A e B.

Os locos D10S1237 e HUMF13B não estão em nenhum kit existente no mercado e são validados anualmente por testes de proficiência externa.

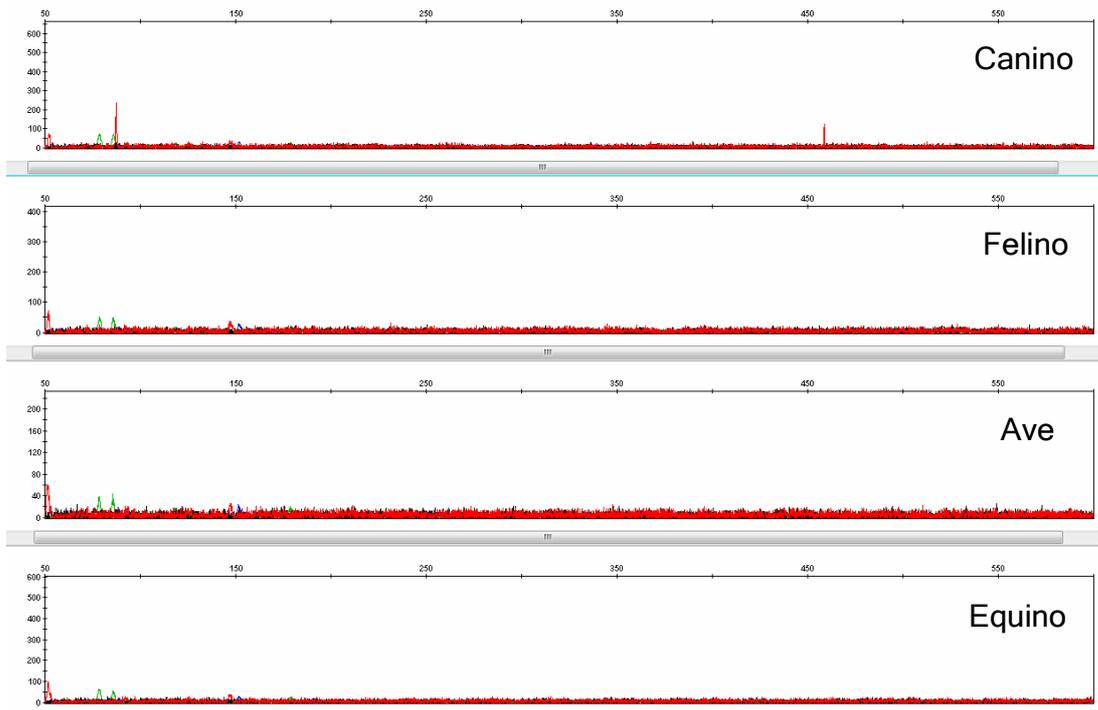
|                  | HUMTPOX | HUMVWA | D13S317 | D18S51 | Penta D | Amelogenina | D5S818 | D21S11 | HUMCSF1PO | D10S1237 | D2S1338 | D3S1358 | D16S539 | D7S820 | HUMFIBRA/FGA | D1S1656 | D8S1179 | D19S433 | HUMTH01 | HUMF13B | D22S1045 | Penta E | D2S441 | D10S1248 | D12S991 | SE33 |
|------------------|---------|--------|---------|--------|---------|-------------|--------|--------|-----------|----------|---------|---------|---------|--------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|--------|----------|---------|------|
| Athos PCR Direta | ■       | ■      | ■       | ■      | ■       | ■           | ■      | ■      | ■         | ■        | ■       | ■       | ■       | ■      | ■            | ■       | ■       | ■       | ■       | ■       | ■        | ■       | ■      | ■        | ■       | ■    |
| Kit A            | ■       | ■      | ■       | ■      | ■       | ■           | ■      | ■      | ■         | ■        | ■       | ■       | ■       | ■      | ■            | ■       | ■       | ■       | ■       | ■       | ■        | ■       | ■      | ■        | ■       | ■    |
| Kit B            | ■       | ■      | ■       | ■      | ■       | ■           | ■      | ■      | ■         | ■        | ■       | ■       | ■       | ■      | ■            | ■       | ■       | ■       | ■       | ■       | ■        | ■       | ■      | ■        | ■       | ■    |

**Figura 5** - Comparação dos locos analisados no Athos PCR Direta com relação aos Kits A e B.

*Especificidade*

Foram feitas ampliações utilizando 10 ng de DNA dos animais domésticos mais comuns (canino, felino, ave e equino). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 6.

O Kit Athos PCR Direta atende à especificidade para a detecção de DNA humano.



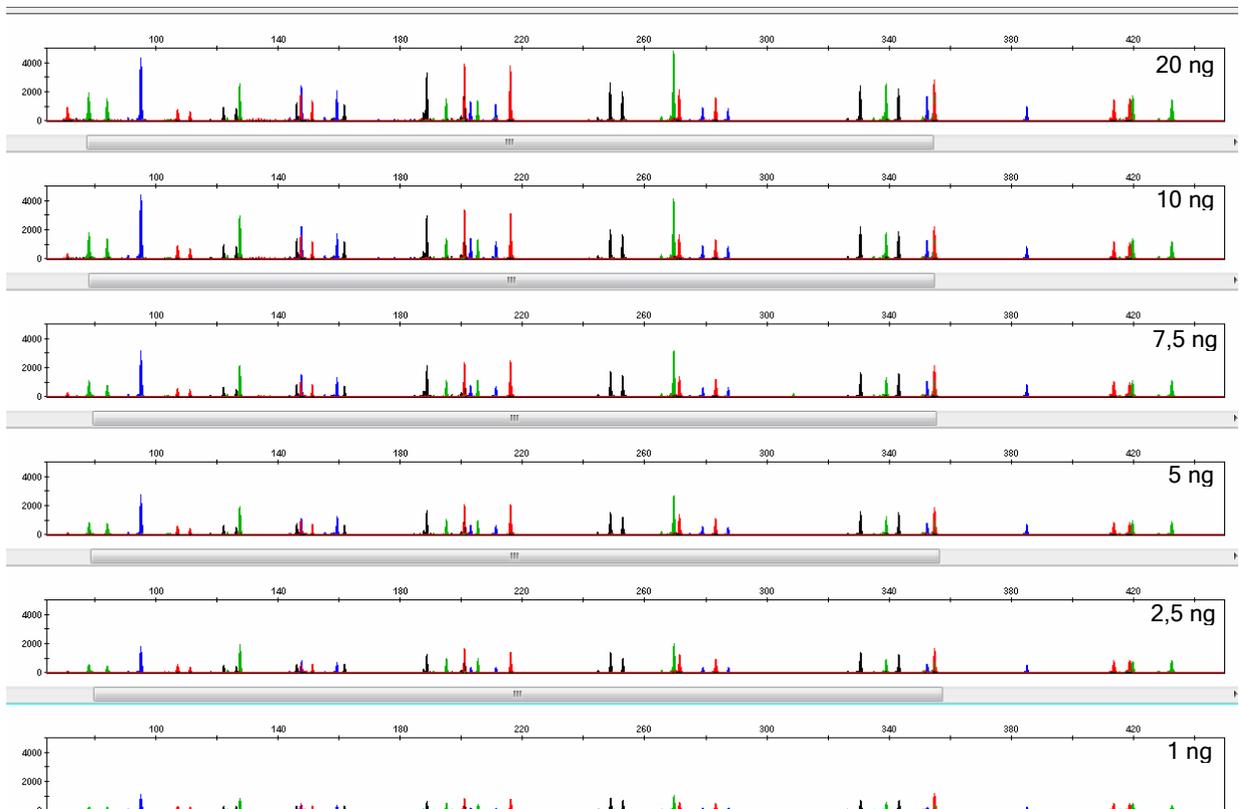
**Figura 6** - Amplificação de DNA de animais domésticos utilizando o kit Athos PCR Direta

## Athos PCR Direta para Identificação Humana

### Sensibilidade

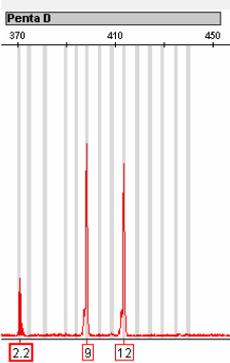
O Kit Athos PCR Direta foi desenvolvido para a análise de identificação humana a partir de amostras de sangue ou saliva em papel filtro Whatman® Protein Saver Cards 903 ou DNA em solução. Foram amplificadas diferentes concentrações de DNA variando de 1- 20 ng. Os resultados obtidos estão na Figura 7.

Com 1ng de DNA foi observada a amplificação de todos os alelos dos 21 locos de STRs autossômicos e do marcador Amelogenina. A intensidade do sinal em todos os locos ficou acima de 150 RFUs.



**Figura 7** - Eletroferograma de DNA em solução variando de 1- 20 ng amplificado com o kit Athos PCR Direta gerado pelo GeneMapper® Software 5.

## 8. Troubleshooting

| Ocorrência   | Possíveis causas   | Recomendação   |
|--|--|--|
| Sinal baixo ou ausência de sinal do controle positivo 002MDD e das amostras  | Volume do Master Mix incorreto, ausência do PCR Mix ou Primer Mix, programação incorreta do termociclador                                    | Verificar os volumes de reação, o programa do termociclador e repetir a amplificação   |
| Sinal baixo ou ausência de sinal das amostras de DNA em solução  | Qualidade e quantidade de amostra, volume do Master Mix incorreto, ausência do PCR Mix ou Primer Mix, programação incorreta do termociclador | Verificar a concentração das amostras, os volumes de reação, o programa do termociclador e repetir a amplificação                              |
| Sinal baixo ou ausência de sinal das amostras de DNA em papel filtro   | Qualidade e quantidade de amostra, volume do Master Mix incorreto, ausência do PCR Mix ou Primer Mix, programação incorreta do termociclador | Fazer a lavagem do disco de acordo com as instruções do fabricante, os volumes de reação, o programa do termociclador e repetir a amplificação |
| Manchas ou picos inespecíficos em discos com amostra de sangue ou saliva   | Qualidade e quantidade de amostra  | Fazer a lavagem do disco de acordo com as instruções do fabricante e repetir a amplificação  |
| Amplificação apenas dos alelos maiores   | Volume do Primer Mix incorreto   | Repetir a amplificação   |
| Pico inespecífico no loco Penta D (alelo 2.2) com amostra de DNA em solução<br> | Qualidade e quantidade de amostra  | A intensidade do alelo 2.2 inespecífico é bem inferior ao dos alelos verdadeiros.<br>Se houver dúvida, o loco deve ser retirado da análise.    |

## **9. Segurança**

O produto não contém componentes em concentração suficiente para causar efeito tóxico.

Todos os reagentes químicos devem ser manuseados com cuidado.

Proteção das Mãos: uso de luvas

Proteção dos Olhos: uso de óculos de proteção

Proteção da Pele e Corpo: uso de roupas/aventais apropriados

Medidas de Higiene: manusear de acordo com as boas práticas de laboratório e segurança

Contato para Emergência: +55 11 3288-1188

**Produto somente para pesquisa. Não deve ser utilizado para diagnóstico animal ou humano ou usos terapêuticos.**

