



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Ospedale Didattico Veterinario

PROCEDURA N°19
Allegato 3 – Istruzioni operative BG



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Estrazione DNA"

IO.BG.1/PRO.2
Ed.02

Pagina 1 di 7

Servizio di Biotechnologie Genetiche

Protocollo "Estrazione DNA"

Nella presente Istruzione operativa sono descritte le seguenti procedure di estrazione del DNA:

1. Estrazione Qiaamp Dna Mini and Blood Mini
2. Estrazione Qiaagen da tampone buccale (Variante Cotton & Dacron Swab)
3. Estrazione Qiaagen da tampone buccale (Variante Omni Swab)



 UNIVERSITA' DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	IO.BG.1/PRO.2 Ed.02 Pagina 2 di 7
---	---

ESTRAZIONE QIAamp DNA Mini and Blood Mini

Preparazione Provette

Tabella provette in ordine di utilizzazione:

Identificazione provette	Tipologia	Step procedurali in sintesi
Iniziale A	1.5 ml microcentrifuge	Da inizio fino a etanolo
Colonnina QIA (analogo alla colonnina col filtro rosso del Kit Sigma)	2.0 ml DNeasy Mini Spin Column	Trasferimento tutto contenuto A e centrifuga
Provetta B	2.0 ml collection tube	Trasferimento filtro, aggiunta di AW1 e centrifuga
Provetta C	2.0 ml collection tube	(dopo AW1 e centrifuga) aggiunta di AW2 e centrifuga
Provetta D	2.0 ml collection tube	(dopo AW2 e centrifuga) giro a vuoto per 1 minuto
Finale Deposito campione biologico	1.5 ml microcentrifuge	Trasferimento finale filtro, aggiunta Buffer AE, lasciato a t° ambiente per 1 minuto e centrifuga.

Preparazione dei Buffer

1. Aggiungere **20µl** di **QIAGEN PROTEINASI K** nella provetta **A iniziale** (microcentrifuge da 1.5 ml).
2. Aggiungere in A **200µl** di **SANGUE** del campione biologico in esame (centrifugare se necessario).
3. Aggiungere **in A 200 µl di BUFFER AL** e vortexare per 15 secondi.
4. Mettere in incubazione a bagno maria a **56°C** per **10 minuti**.
5. Centrifugazione rapida per rimuovere le gocce sulle pareti della provetta.
6. Aggiungere in A **200µl** di **ETANOLO ASSOLUTO** (96-100%),
7. Vortexare per 15 secondi e effettuare una centrifugazione rapida.



 UNIVERSITA' DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	IO.BG.1/PRO.2 Ed.02 Pagina 3 di 7
---	---

A questo punto nella provetta A si hanno: 20µl di Proteinasi K, 200µl di sangue, 200µl di Buffer AL e 200µl di Etanolo Assoluto, per un totale di 620µl di soluzione.

8. Trasferire l'intero contenuto di A nelle provette con le Colonnine (2.0 ml collection tube in dotazione del Kit).
9. Effettuare una centrifuga a **8000 rpm per 1 min.**
10. Trasferire il filtro nella provetta di tipo B.
11. Gettare la provetta che inizialmente conteneva il filtro.
12. Aggiungere **in B 500 µl di BUFFER AW1.**
13. Effettuare una centrifuga a **8000 rpm per 1 min.**
14. Trasferire il filtro nella provetta di tipo C.
15. Gettare la provetta B.
16. Aggiungere **in C 500 µl di BUFFER AW2.**
17. Effettuare una centrifuga a full speed **14000 rpm per 3 min.**
18. Trasferire il filtro in una nuova provetta, tipologia D.
19. Gettare la provetta C.
20. Effettuare una centrifuga a full speed **14000 rpm per 1 min.** giro a vuoto per allontanare eventuali residui di lavaggio.
21. Trasferire il filtro nella provetta finale (da 1.5ml microcentrifuge).
22. Aggiungere **200 µl di BUFFER AE.**
23. Lasciare incubare a **temperatura ambiente (25-35°C) per 1 min.**
24. Effettuare una centrifuga a **8000 rpm per 1 min.**



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Estrazione DNA"

IO.BG.1/PRO.2
Ed.02

Pagina 4 di 7

ESTRAZIONE QIAGEN da TAMPONE BUCCALE (Variante cotton & DACRON swab)

Preparazione Provette

Tabella provette in ordine di utilizzazione:

Identificazione provette	Tipologia
Iniziale A	2.0 ml microcentrifuge
Colonnina QIA	2.0 ml DNeasy Mini Spin Column
Provetta B	2.0 ml collection tube
Provetta C	2.0 ml collection tube
Provetta D	2.0 ml collection tube
Provetta E	2.0 ml collection tube
Finale Deposito campione biologico	1.5 ml microcentrifuge

Procedura

1. Mettere il tampone in una provetta **A** da 2.0 ml microcentrifuge;
aggiungere **400 µl** di **PBS**.
2. Aggiungere in **A** **20 µl** di **PROTEINASI K**;
aggiungere in **A** **400 µl** di **BUFFER AL**;
vortexare per 15 sec.
3. Mettere in incubazione a bagnomaria a **56°C** per **10 minuti**;
effettuare una centrifugazione veloce.
4. Aggiungere in **A** **400 µl** di **ETANOLO ASSOLUTO**;
vortexare per 15 sec;
effettuare una centrifugazione veloce;
a questo punto nella provetta **A** ci sono **1220 µl** di soluzione.
5. Trasferire nella **COLONNINA** **700 µl** di soluzione;



 UNIVERSITÀ DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	IO.BG.1/PRO.2 Ed.02 Pagina 5 di 7
--	---

NON GETTARE LA PROVETTA A;

effettuare una centrifugazione a **8000 rpm per 1 minuto**;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo B;

gettare la provetta contenente il filtrato.

6. Ripetere lo step 5, aggiungendo nella provetta B, contenente la colonnina, il quantitativo rimanente in A derivante dallo step 4;

centrifugare a **8000 rpm per 1 minuto**;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo C;

gettare la provetta B.

7. Aggiungere nella provetta C **500 µl di BUFFER AW1**;

centrifugare a 8000 rpm per minuto;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo D;

gettare la provetta C.

8. Aggiungere nella provetta D **500 µl di BUFFER AW2**;

centrifugare a **14000 rpm per 3 minuti**.

FACOLTATIVO

Trasferire la colonnina in una nuova provetta E;

gettare la provetta D;

centrifugare a **14000 per 1 minuto**.

9. Trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo microcentrifuge da 1.5ml, (finale);

aggiungere **150 µl di BUFFER AE**;

mettere ad incubazione a **temperatura ambiente per 1 min**;

centrifugare a **8000 rpm per 1 minuto**;

gettare la colonnina eappare la provetta finale.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Estrazione DNA"

IO.BG.1/PRO.2
Ed.02

Pagina 6 di 7

ESTRAZIONE QIAGEN da TAMPONE BUCCALE (Variante OMNI SWAB)

Preparazione Provette

Tabella provette in ordine di utilizzazione:

Identificazione provette	Tipologia
Iniziale A	2.0 ml microcentrifuge
Colonnina QIA	2.0 ml DNeasy Mini Spin Column
Provetta B	2.0 ml collection tube
Provetta C	2.0 ml collection tube
Provetta D	2.0 ml collection tube
Provetta E	2.0 ml collection tube
Finale Deposito campione biologico	1.5 ml microcentrifuge

Procedura

1. Mettere il tampone in una provetta A da 2.0 ml microcentrifuge, aggiungere 400 μ l di PBS.
2. Aggiungere in A 20 μ l di **PROTEINASI K**;
aggiungere in A 400 μ l di **BUFFER AL**;
vortexare per 15 sec.
3. Mettere in incubazione a bagnomaria a 56°C per 10 minuti;
effettuare una centrifugazione veloce.
4. Aggiungere in A 400 μ l di **ETANOLO ASSOLUTO**;
vortexare per 15 sec;
effettuare una centrifugazione veloce.
a questo punto nella provetta A ci sono 1220 μ l di soluzione;
5. Trasferire nella COLONNINA 700 μ l di soluzione;



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.1/PRO.2 Ed.02
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie	Pagina 7 di 7
Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	

NON GETTARE LA PROVETTA A;

effettuare una centrifugazione a **8000 rpm per 1 minuto**;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo **B**;

gettare la provetta contenente il filtrato.

6. Ripetere lo step 5, aggiungendo nella provetta **B**, contenente la colonnina, il quantitativo rimanente in **A** derivante dallo step 4;

centrifugare a **8000 rpm per 1 minuto**;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo **C**;

gettare la provetta **B**.

7. Aggiungere nella provetta **C** **500 µl di BUFFER AW1**;

centrifugare a **8000 rpm per minuto**;

trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo **D**;

gettare la provetta **C**.

8. Aggiungere nella provetta **D** **500 µl di BUFFER AW2**;

centrifugare a **14000 rpm per 3 minuti**.

FACOLTATIVO

Trasferire la colonnina in una nuova provetta **E**;

gettare la provetta **D**;

centrifugare a **14000 per 1 minuto**.

9. Trasferire la colonnina in una nuova provetta di tipo microcentrifuge da 1.5ml, (finale);

aggiungere **150 µl di BUFFER AE**;

mettere ad incubazione a **temperatura ambiente per 1 min**;

centrifugare a **8000 rpm per 1 minuto**;

gettare la colonnina e tappare la provetta finale.



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Ospedale Didattico Veterinario

PROCEDURA N°19
Allegato 3 – Istruzioni operative BG



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotecnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 1 di 18

Servizio di Biotecnologie Genetiche

Protocollo "Test parentale"

Nella presente Istruzione operativa è descritta la seguente procedura:

applied biosystems

Canine ISAG STR Parentage Kit (2014)

USER GUIDE

Parentage testing and individual identification using multiplex
PCR of short tandem repeat loci

Catalog Numbers A36138, A36139

Publication Number MAN0017047

Revision B.0

 **Manufacturers:** ThermoFisher Scientific | 7, Kingsland Grange | Warrington, Cheshire WA1 4SR | United Kingdom

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Revision History: Pub. No. MAN0017047

Revision	Date	Description
B.0	05 December 2017	Correct REMGFP11 marker label in Figure 1
A.0	05 October 2017	New document

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

TRADEMARKS: All trademarks are the property of ThermoFisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

©2017 ThermoFisher Scientific Inc. All rights reserved.



 UNIVERSITÀ DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE	Pagina 2 di 18
Biotechnologie Genetiche Protocollo "Test parentale"	



Product information

IMPORTANT! Before using this product, read and understand the information in the "Safety" appendix in this document.

Product description

The Canine ISAG STR Parentage Kit (2014) enables parentage testing and individual identification of canine samples using a multiplex PCR assay that targets highly accurate and informative polymorphic short tandem repeats (STRs). STR loci, or microsatellites, are tandemly repeated sequence motifs of two to seven base pairs in length. STR alleles are identified by the number of times a given sequence motif is repeated in the locus. The Canine ISAG STR Parentage Kit (2014) encompasses 22 STR loci recommended by the Applied Genetics Committee of Companion Animals of the International Society for Animal Genetics (ISAG; www.isag.us) for routine use in canine parentage testing and individual identification.

The kit contains all reagents necessary to co-amplify 21 STR loci and the amelogenin sex-determining locus in a single multiplex PCR reaction (see "Loci amplified by the Canine ISAG STR Parentage Kit (2014)" on page 6). The amplified PCR fragments are separated in a single electrophoresis injection to generate genotypes for each amplified locus. The kit includes:

- **Canine STR Master Mix** – includes optimized buffer and Phusion™ Hot Start DNA Polymerase for multiplex PCR amplification. Phusion™ Hot Start DNA Polymerase enables robust amplification of all targets during STR multiplexing.
- **Canine 22 STR Primer Panel** – includes optimized buffer and forward and reverse primers for 21 STR loci and the amelogenin sex-determining locus. One primer from each primer pair is end-labeled with a fluorescent dye.
- **Canine gDNA Control** – serves as a positive control for verification of PCR amplification and electrophoresis. The genomic DNA was extracted from the ATCC "MDCKM" canine cell line.

The reagents and protocols included with this kit were designed to deliver similar peak sizes (amplification yields) for each locus. The use of high-fidelity Phusion™ Hot Start DNA Polymerase ensures:

- **True allele calls.** Allele calls made using the kit represent the true allele of an individual, instead of 'plus-A' peaks or 'split peaks' typically seen when using a conventional DNA polymerase without proofreading activity.
- **Robust and high-yield amplification of all target loci.** In STR multiplexing, the high processivity of Phusion™ Hot Start DNA Polymerase enables reliable amplification of even the longest fragments and avoids allele 'drop-out' occurrences.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotecnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 3 di 18

Loci amplified by
the Canine ISAG
STR Parentage Kit
(2014)

Size ranges for STR loci in canine gDNA were determined after electrophoresis using the 3500xL Genetic Analyzer with POP-4™ Polymer. Results vary with different instruments and polymers.

Locus name	Chromosome	Repeat motif	Size range (bp) ^(1,2)	Dye	Dye color ⁽³⁾
AHT121	13	di	68-120	PET™	Red
AHT137	11	di	121-156	VIC™	Green
AHT130	36	di	269-343	FAM™	Blue
AHT171	6	di	213-243	PET™	Red
AHT1260	16	di	228-254	VIC™	Green
AHT1211	26	di	79-101	FAM™	Blue
AHT1253	23	di	277-301	VIC™	Green
Amelogenin	X	—	174-218	NED™	Black
COX279	22	di	103-135	FAM™	Blue
FH2054	12	tetra	135-179	PET™	Red
FH2848	2	di	222-244	NED™	Black
INRA21	21	di	83-111	VIC™	Green
INU005	32	di	100-136	NED™	Black
INU030	12	di	137-159	NED™	Black
INU055	10	di	183-217	FAM™	Blue
REN105L03	11	di	279-353	NED™	Black
REN162C04	7	di	186-212	PET™	Red
REN169D01	14	di	181-221	VIC™	Green
REN169O18	29	di	146-174	FAM™	Blue
REN247M23	15	di	258-282	PET™	Red
REN56P11	18	di	218-248	FAM™	Blue
REN64E19	34	di	292-350	PET™	Red

⁽¹⁾ Size ranges are based on in-house raw data. Adjusting your raw data to ISAG allele nomenclature.

⁽²⁾ The data represents a large selection of dog breeds. However, some breeds may have alleles outside the ranges provided.

⁽³⁾ Dye colors are listed as they appear following electrophoresis with Filter Set 65.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

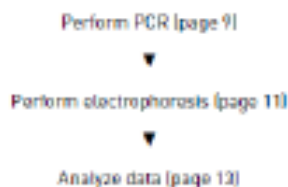
Pagina 4 di 18

Item	Source
Tubos, plates, and other consumables	
Plastics consumables	thermofisher.com/plastics
Pipette tips	thermofisher.com/pipettetips
Disposable gloves	MLS

Table 3 Reagents for DNA extraction, PCR, and electrophoresis

Item	Source
Kits for DNA extraction	
MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit	A32700
Alternative kits for genomic DNA extraction	thermofisher.com/mygdnaprep
Reagents	
Nuclease-Free Water	MLS
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0	4408399
DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set GSI)	4345803
One of the following:	
• POP-4™ Polymer for 3500/3500xL	A24070
• POP-4™ Polymer for 3130/3130xL	4360752
Hi-Di™ Formamide	4311320

Workflow





UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotecnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 5 di 18



Methods

Guidelines for input gDNA

- Extract and purify genomic DNA (gDNA) according to standardized practices. For recommended kits and ordering information, see "Required materials not supplied" on page 7.
- The Canine ISAG STR Parentage Kit (2014) is designed for use with dog hair, cheek swab, and blood samples. However, the kit can be used with any tissue providing high-quality gDNA.
- For optimal results, use 1–2 ng of high-quality gDNA per reaction. Dilute gDNA samples to the appropriate concentration. The kit delivers acceptable results with gDNA amounts ranging from 0.5–10 ng. Too little or too much template DNA can result in:
 - Minimal or no amplification of STR loci
 - Nonspecific amplification products

Perform PCR

Procedural guidelines

- Store the Canine 22 STR Primer Panel frozen and away from light until use. Excessive exposure to light may affect the fluorescent dyes.
- To maximize the specificity and uniformity of the amplification products, set up PCR reactions on ice.

Before you begin

- Calculate the number of reactions required, including recommended controls.

Reaction type	Component
Test sample	Sample gDNA
Positive control	Canine gDNA Control
Negative control	Nuclease-free water

- Thaw reagents on ice, then vortex and briefly centrifuge to resuspend.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 6 di 18



Methods

Guidelines for input gDNA

- Extract and purify genomic DNA (gDNA) according to standard practices. For recommended kits and ordering information, see "Required materials not supplied" on page 7.
- The Canine ISAG STR Parentage Kit (2014) is designed for use with dog hair, cheek swab, and blood samples. However, the kit can be used with any tissue providing high-quality gDNA.
- For optimal results, use 1–2 mg of high-quality gDNA per reaction. Dilute gDNA samples to the appropriate concentration. The kit delivers acceptable results with gDNA amounts ranging from 0.5–10 ng. Too little or too much template DNA can result in:
 - Minimal or no amplification of STR loci
 - Nonspecific amplification products

Perform PCR

Procedural guidelines

- Store the Canine 22 STR Primer Panel frozen and away from light until use. Excessive exposure to light may affect the fluorescent dyes.
- To maximize the specificity and uniformity of the amplification products, set up PCR reactions on ice.

Before you begin

- Calculate the number of reactions required, including recommended controls.

Reaction type	Component
Test sample	Sample gDNA
Positive control	Canine gDNA Control
Negative control	Nuclease-free water

- Thaw reagents on ice, then vortex and briefly centrifuge to resuspend.

Prepare PCR Reaction Mix on ice

1. Combine the following components for the required number of reactions plus 10% overage.

Component	Volume per reaction
Canine STR Master Mix	9 µL
Canine 22 STR Primer Panel	9 µL



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 7 di 18

Prepare the PCR reactions on ice

2. Vortex briefly to mix.
3. Centrifuge briefly to bring PCR Reaction Mix to the bottom of the tube and to eliminate air bubbles.
1. Transfer 18 μ L of PCR Reaction Mix to the appropriate wells of a 96-well plate or tubes on ice.
2. Add 2 μ L of the appropriate component for the reaction type, according to the table.

Reaction type	Component
Test sample	Sample gDNA
Positive control	Canine gDNA Control
Negative control	Nuclease-Free Water

3. Seal each reaction container, mix, then centrifuge briefly to bring the contents to the bottom.

Set up and run the PCR reaction

For more information about setting up a PCR run, see the appropriate documentation for your instrument.

1. Load the reaction plate or tubes in the thermal cycler.
2. Set up the instrument run using the following parameters:
 - Reaction volume: 20 μ L.
 - Ramp rate:

Thermal cycler	Ramp rate
GenoAmp™ PCR System 9700	100%
Voriti™ Thermal Cycler	60%
SimpliAmp™ Thermal Cycler	2.5°C/sec
2720 Thermal Cycler	100%

- Thermal cycling conditions:

Step	Temp.	Length	Cycles
Enzyme activation	98°C	3 minute	1
Denature	98°C	15 second	30
Anneal	60°C	75 second	
Extend	72°C	30 second	
Final extension	72°C	5 minute	1
Final hold	4°C	∞	1

3. Start the run.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotecnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 8 di 18

Perform electrophoresis

Before you begin

- Generate a matrix file using the DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5). For more information about generating a matrix file, see the appropriate documentation for your instrument.
- (Recommended) To optimize allele fluorescence intensities, prepare a dilution series (undiluted, 1:5, 1:10, 1:20, and 1:40) of the PCR products in water, then perform electrophoresis. Use a dilution that has an allele fluorescence intensity range in the recommended range for your instrument:

Instrument	Recommended fluorescence intensity range ⁽¹⁾	Fluorescence saturation
3500/3500xL Genetic Analyzer	300–20,000 RFU	30,000 RFU
3130/3130x Genetic Analyzer	300–6,000 RFU	8,000 RFU

⁽¹⁾ Interpret peaks outside of the recommended fluorescence intensity range with caution.

Prepare Electrophoresis Reaction Mix

1. Combine the following components for the required number of reactions plus 10% overage.

Component	Volume per reaction
Hi-Di™ Formamide	10 µL
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0	0.3 µL

2. Vortex briefly to mix.
3. Centrifuge briefly to bring Electrophoresis Reaction Mix to the bottom of the tube and eliminate air bubbles.

Prepare the electrophoresis reactions

1. Combine the following components in the appropriate wells of a 96-well plate:

Component	Volume
Electrophoresis Reaction Mix	10 µL
PCR product	1.5 µL

2. Cover the plate, then centrifuge to bring the mixture to the bottom of the wells and to eliminate air bubbles.
3. Incubate at 95°C for 3 minutes to denature the DNA fragments.
4. Immediately incubate the plate on ice for at least 3 minutes.
5. Place a rubber septa onto the 96-well plate.



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie

Biotechnologie Genetiche
Protocollo "Test parentale"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 9 di 18

Set up and run the electrophoresis

For more information about setting up an electrophoresis run, see the appropriate documentation for your instrument.

1. Set up an instrument run using the following parameters:

- Polymer: POP-4™
- Capillary length: 36 cm
- Dye set: GS
- Electrophoresis conditions:
 - 3500/3500xL Genetic Analyzer

Condition	Setting
Oven temperature	60°C
Run time	1,210 seconds
Run voltage	15 kV
PreRun time	180 seconds
PreRun voltage	15 kV
Injection time	3500 Genetic Analyzer – 15 seconds 2500xL Genetic Analyzer – 24 seconds
Injection voltage	1.2 kV
Data delay	1 second


- 3130/3130xL Genetic Analyzer

Condition	Setting
Oven temperature	60°C
Run time	1,500 seconds
Run voltage	15 kV
Injection time	12 seconds
Injection voltage	1.2 kV

2. Assemble the plate with the Retainer and Base, then load on the instrument.

3. Start the run.



 UNIVERSITA' DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie Biotecnologie Genetiche Protocollo "Test parentale"	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01 Pagina 10 di 18
---	---

Analyze data


Analyze data using GeneMapper™ Software. See the *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide* (Pub. No. 4474504) for detailed information.

Visit thermo.com/A36138 to download bin files for data analysis.

Guidelines for data analysis

- The kit has been designed to deliver similar peak sizes in and among loci, when applying an appropriate amount of high-quality gDNA. However, peak height and balance can vary from animal to animal.
- PCR and electrophoresis conditions are acceptable when the fluorescence intensities of the alleles for the positive control fall in the recommended range for your instrument. See "Before you begin" on page 11.
- We recommend optimizing the PCR product dilutions that are used for electrophoresis. See "Before you begin" on page 11.
- The size ranges of the alleles are based on genotyping studies including a large selection of dog breeds (see "Loci amplified by the Canine ISAG STR Parentage Kit (2014)" on page 6). It is possible that some dog breeds have alleles that fall outside the ranges provided. Such alleles are expected to occur at low frequencies.
- Most STR loci that are targeted by the PCR assay have alleles occurring in 2-bp or 4-bp intervals. Some loci can have alleles occurring less than 2 bp apart because:
 - Some breeds have insertions or deletions in STR loci or sequences flanking them.
 - Some breeds have altered STR locus base composition that results in slightly shifted fragment migration during electrophoresis.



 UNIVERSITÀ DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotechnologie Genetiche Protocollo "Test parentale"	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01 Pagina 11 di 18
---	--

Positive control alleles Allele sizes were determined after electrophoresis using the 3500xL Genetic Analyzer with POP-4™ Polymer. Results vary with different instruments and polymers.

Table 4 Alleles for STR loci in the Canine gDNA Control

Locus name	Size (bp) ^[1]	
FAM™ dye (blue)^[2]		
AHTK211	83	—
CKK279	114	120
REN16901B	157	159
INU055	199	203
REN54P11	224	—
AHTH130	301	307
VIC™ dye (green)^[2]		
INRA21	87	93
AHT137	127	—
REN169001	205	209
AHTH260	235	247
AHTK253	265	291
NED™ dye (black)^[2]		
INU005	102	108
INU030	129	145
Amelogenin	213	—
FH2048	225	229
REN105L03	319	325
PET™ dye (red)^[2]		
AHT121 ^[3]	106	108
FH2054	149	169
REN162014	202	—
AAHTH171	219	221
REN247M23	267	271
REN64E19	327	337

^[1] Size ranges are based on in-house raw data. Adjust your raw data to ISAC allele nomenclature.

^[2] Dye colors are listed as they appear following electrophoresis with Filter Set 05.

^[3] AHT121 has a background peak at 114 bp which can be disregarded. See "Discriminate AHT121 genotypes" on page 16.



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie
Biotecnologie Genetiche
Protocollo "Estrazione DNA"

IO.BG.2/PRO.2
Ed.01

Pagina 12 di 18

Canine ISAG STR Profiling Kit (2014) User Guide

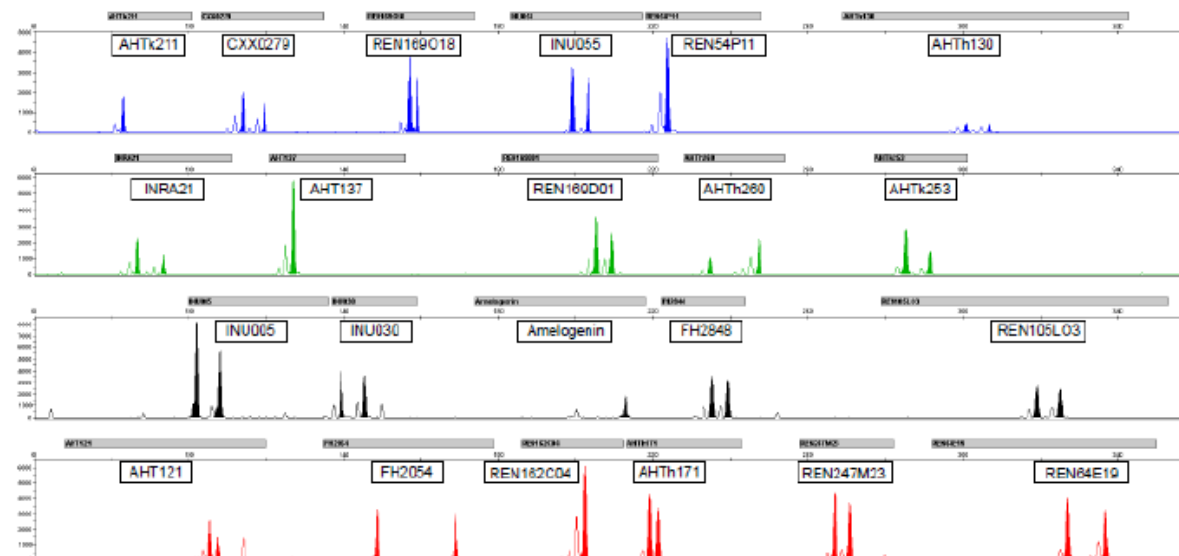


Figure 1 Canine gDNA Control genotyping profile

See "Discriminate AHT121 genotypes" on page 16 for information about the non-specific background peak in the AHT121 peak profile.



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotechnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	Pagina 13 di 18

Discriminate AHT121 genotypes

AHT121 has a nonspecific background peak at 114 bp. When present as a single peak, the amplification at 114 bp can be disregarded as a nonspecific background peak (Figure 2).

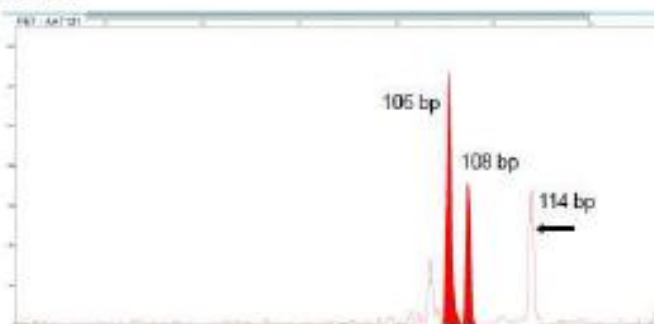


Figure 2 - AHT121 nonspecific background peak

The arrow indicates the background peak. This background peak can be discriminated from a true allele as it does not generate the traditional stutter peak.

When present with a stutter peak, the amplification at 114 bp can be identified as the true allele (Figure 3).

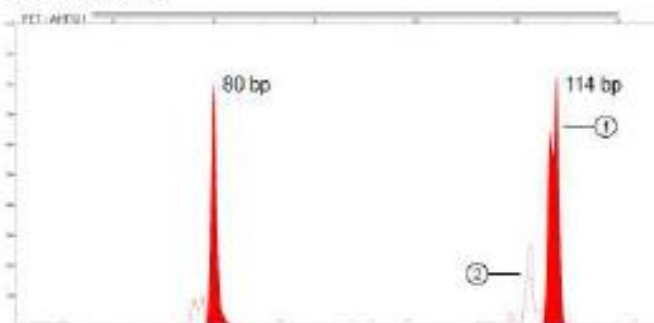


Figure 3 - AHT121 true allele with stutter peak

The amplification at 114 bp is the overlap of the background peak and the true allele peak (1). The true allele can be discriminated from the background peak as it generates the traditional stutter peak (2).



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie	Pagina 14 di 18
Biotechnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	

Allele calls and stutter peaks

STR locus amplification can result in one or more stutter peaks. Stutter peaks typically lack one repeat unit relative to the true allele. Stutter peaks for dinucleotide loci are typically 2 bp shorter than the true alleles, and stutter peaks for tetranucleotide loci are typically 4 bp shorter than the true alleles.

When making allele calls, note:

- Longer alleles for a locus can display smaller amplification yields (peak sizes) than the shorter alleles.
- Stutter peaks are typically much smaller than the true allele peak.
- In some loci, the longer alleles can display more stuttering than the shorter alleles.

The following figures represent typical peak profiles for homozygous individuals, heterozygous individuals with the two alleles > 2 bp apart and heterozygous individuals with the two alleles exactly 2 bp apart.

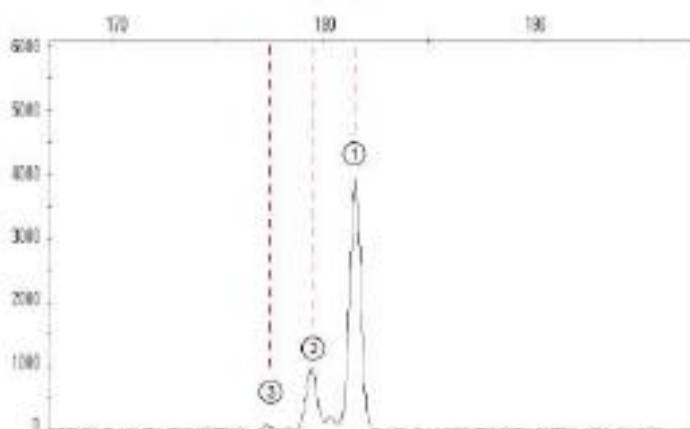


Figure 4. Typical dinucleotide STR peak profile for a homozygous individual. The peaks correspond to the following PCR amplicons: the true allele (1), the -2-bp stutter peak (2), and the -4-bp stutter peak (3).



 UNIVERSITÀ DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE	Pagina 15 di 18
Biotechnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	

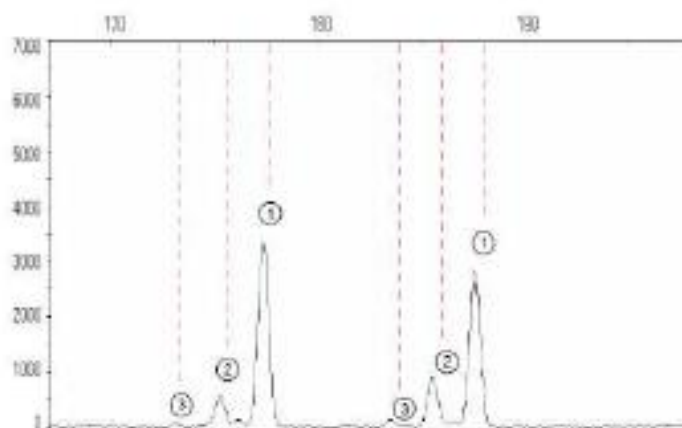


Figure 5 Typical dinucleotide STR peak profile for a heterozygous individual with the two alleles > 2 bp apart
The peaks correspond to the following PCR amplicons: the true allele (1), the -2-bp stutter peak (2), and the -4-bp stutter peak (3).

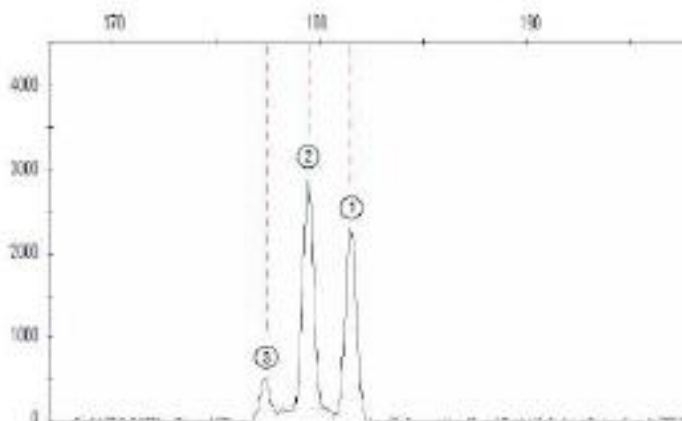


Figure 6 Typical dinucleotide STR peak profile for a heterozygous individual with the two alleles exactly 2 bp apart
The peaks correspond to the following PCR amplicons: the true long allele (1), the true short allele and the -2-bp stutter peak of the long allele (2), and the -4-bp stutter peak of the long allele and the -2-bp stutter peak of the short allele (3).



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	Pagina 16 di 18



Troubleshooting

Observation	Possible cause	Recommended action
Faint or no signals from the test samples for all loci, but normal signals for all loci from the control DNA	The DNA quantity of the test sample is below the limit of detection of the assay.	Measure the DNA concentration and use the recommended amount of input DNA.
	The test sample DNA contains PCR inhibitors.	Dilute the sample DNA in Nuclease-Free Water (for example 1:2, 1:5, and 1:20 dilutions), then repeat the PCR and electrophoresis.
Faint or no signals from both the test samples and the control DNA	There has been a user error in the PCR or electrophoresis setup.	Repeat the PCR and electrophoresis.
	The thermal cycling conditions are not optimal for use with the kit.	Check the PCR program.
Nonspecific amplification in test samples, but normal signals from all loci in the control	The concentration of sample DNA in the PCR is too high.	Measure the DNA concentration and use the recommended amount of input DNA. Alternatively, dilute the sample DNA in water (for example 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20 dilutions), then repeat the procedure.
	The sample DNA is contaminated.	Avoid contamination of DNA in the work environment by following good laboratory practices for PCR setup.
Nonspecific amplification in test samples and in the control	There has been a user error in the PCR or electrophoresis setup.	Repeat the PCR and electrophoresis.
	The thermal cycling conditions are not optimal for use with the kit.	Check the PCR program.



Safety



WARNING! GENERAL SAFETY. Using this product in a manner not specified in the user documentation may result in personal injury or damage to the instrument or device. Ensure that anyone using this product has received instructions in general safety practices for laboratories and the safety information provided in this document.

- Before using an instrument or device, read and understand the safety information provided in the user documentation provided by the manufacturer of the instrument or device.
- Before handling chemicals, read and understand all applicable Safety Data Sheets (SDSs) and use appropriate personal protective equipment (gloves, gowns, eye protection, etc). To obtain SDSs, see the "Documentation and Support" section in this document.



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie Biotecnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	Pagina 17 di 18

Chemical safety



WARNING! GENERAL CHEMICAL HANDLING. To minimize hazards, ensure laboratory personnel read and practice the general safety guidelines for chemical usage, storage, and waste provided below. Consult the relevant SDS for specific precautions and instructions:

- Read and understand the Safety Data Sheets (SDS) provided by the chemical manufacturer before you store, handle, or work with any chemicals or hazardous materials. To obtain SDSs, see the "Documentation and Support" section in this document.
- Minimize contact with chemicals. Wear appropriate personal protective equipment when handling chemicals (for example, safety glasses, gloves, or protective clothing).
- Minimize the inhalation of chemicals. Do not leave chemical containers open. Use only with adequate ventilation (for example, fume hood).
- Check regularly for chemical leaks or spills. If a leak or spill occurs, follow the manufacturer's cleanup procedures as recommended in the SDS.
- Handle chemical wastes in a fume hood.
- Ensure use of primary and secondary waste containers. (A primary waste container holds the immediate waste. A secondary container contains spills or leaks from the primary container. Both containers must be compatible with the waste material and meet federal, state, and local requirements for container storage.)
- After emptying a waste container, seal it with the cap provided.
- Characterize (by analysis if necessary) the waste generated by the particular applications, reagents, and substrates used in your laboratory.
- Ensure that the waste is stored, transferred, transported, and disposed of according to all local, state/provincial, and/or national regulations.
- **IMPORTANT!** Radioactive or biohazardous materials may require special handling, and disposal limitations may apply.

Biological hazard safety



WARNING! BIOHAZARD. Biological samples such as tissues, body fluids, infectious agents, and blood of humans and other animals have the potential to transmit infectious diseases. Conduct all work in properly equipped facilities with the appropriate safety equipment (for example, physical containment devices). Safety equipment can also include items for personal protection, such as gloves, coats, gowns, shoe covers, boots, respirators, face shields, safety glasses, or goggles. Individuals should be trained according to applicable regulatory and company/institution requirements before working with potentially biohazardous materials. Follow all applicable local, state/provincial, and/or national regulations. The following references provide general guidelines when handling biological samples in laboratory environment:

- U.S. Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009; found at: www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb5/BMBL.pdf
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd Edition, WHO/CDS/CSE/LYO/2004.11; found at: www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf



 UNIVERSITA' DI PISA	IO.BG.2/PRO.2 Ed.01
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie	Pagina 18 di 18
Biotechnologie Genetiche Protocollo "Estrazione DNA"	



Documentation and support

Related documentation

Document	Publication number
<i>DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide</i>	4474504
<i>GeneAmp™ PCR System 9700 Base Module User Manual</i>	4303481
<i>Went™ Thermal Cycler User Guide</i>	4375799
<i>SimpliAmp™ Thermal Cycler User Guide</i>	MAN0001889
<i>Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler Quick Reference Card</i>	4359451
<i>3500/3500XL Genetic Analyzer with 3500 Series Data Collection Software v1 User Guide</i>	4401661
<i>3130/3130XL Genetic Analyzers Getting Started Guide</i>	4352715

Customer and technical support

Visit thermo.fisher.com/support for the latest in services and support, including:

- Worldwide contact telephone numbers
- Product support, including:
 - Product FAQs
 - Software, patches, and updates
 - Training for many applications and instruments
- Order and web support
- Product documentation, including:
 - User guides, manuals, and protocols
 - Certificates of Analysis
 - Safety Data Sheets (SDSs; also known as MSDSs)

Note: For SDSs for reagents and chemicals from other manufacturers, contact the manufacturer.



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Ospedale Didattico Veterinario

PROCEDURA N°19
Allegato 3 – Istruzioni operative BG

 UNIVERSITA' DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotechnologie Genetiche - Emissione del referto -	IO.10/PRO.2 Ed.03 Pagina 1 di 1
--	--

Servizio di Biotechnologie Genetiche

Emissione del referto

Il referto prodotto dal servizio di Biotechnologie Genetiche (BG), relativo al Test Parentale richiesto da ENCI al proprietario della fattrice viene compilato previa verifica dei dati da parte del Responsabile Qualità del Servizio (RQS) sulla base dei risultati delle prove eseguite.

Ogni referto è identificato da un codice univoco e riporta le informazioni relative al servizio di BG e al soggetto committente, la descrizione del campione e delle analisi eseguite, i risultati ottenuti e i valori di riferimento (ove previsto e/o richiesto).

PARERIE INTERPRETAZIONI

Eventuali pareri e interpretazioni richiesti dal cliente sono prodotti da RQS, che ne autorizza l'emissione e li allega al referto.

CONVALIDA E CONSEGNA DEL REFERTO

Una volta verificati i dati, il referto viene stampato, firmato da RQS e timbrato per convalida. Il documento originale viene conservato nell'archivio cartaceo annuale delle pratiche ENCI.

Una versione pdf non manomissibile viene ottenuta mediante una scansione del documento originale timbrato e firmato. Una copia viene conservata nell'archivio informatico nel computer di RQS, organizzato per pratica cliente e per anno solare e riportante in ciascuna cartella i file ppt e pdf ottenuti dalla scansione del referto originale timbrato e firmato.

Contestualmente, l'archivio è salvato sulla memoria esterna del Centro Serra assegnata al servizio di BG. Un numero di referti originali, firmati e timbrati da RQS, protocollati e controfirmati dal Direttore del Dipartimento di Scienze Veterinarie, pari ed uguale a quanti siano i committenti del test parentale ENCI, viene inviato insieme ai documenti di fatturazione per posta ordinaria, per posta elettronica in formato pdf o consegnato con gli stessi direttamente al cliente. I tempi di consegna o invio del referto relativo alle analisi effettuate sono comunicati al cliente al momento della consegna del campione.

GESTIONE DELLE CORREZIONI

Nel caso in cui si debbano eseguire correzioni sul referto dopo la sua emissione, si deve procedere alla produzione di un nuovo documento che, oltre a riportare tutte le voci e l'identificativo del precedente referto, reca la modifica e/o l'integrazione.



Università di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie

Ospedale Didattico Veterinario

PROCEDURA N°19
Allegato 3 – Istruzioni operative BG

 UNIVERSITÀ DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie Biotechnologie Genetiche Registrazione e accettazione dei campioni	IO.4/PRO.2 Ed.02 Pagina 1 di 3
---	---

Servizio di Biotechnologie Genetiche

Registrazione e accettazione dei campioni da sottoporre ad analisi

La presente Istruzione Operativa si applica a tutte le tipologie di campioni da sottoporre alle prove analitiche riportate nel tariffario del servizio.

In attesa della consegna dei campioni, tranne la VetKard per la quale è necessaria la conservazione a temperatura ambiente, è prevista una preliminare conservazione presso l'accettazione in frigorifero, per non più di 1 giorno. Dopo questo periodo i campioni sono conservati nel congelatore del laboratorio a -20° C.

REGISTRAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni possono essere inviati al laboratorio per posta ordinaria, mediante corriere espresso o consegnati direttamente dal cliente. Al momento dell'arrivo in laboratorio la registrazione dei campioni deve essere effettuata sul Registro d'Ingresso (cartaceo) sul quale vanno riportati i seguenti dati:

- numero di matricola identificativo, nome, data di nascita e razza di appartenenza del cane
- codice LOI ENCI, numero di microchip o tattoo del cane
- nome del Veterinario che ha effettuato il prelievo del campione biologico
- data di prelievo, di arrivo e di accettazione del campione biologico
- nome del proprietario o di chi ha commissionato l'analisi
- concentrazione del DNA estratto
- tipologia di analisi richiesta

Contestualmente deve essere verificato se sull'etichetta del campione è riportato il nome del cliente e il codice LOI con il nome del cane ed il microchip. Deve essere inoltre riportato il codice interno del laboratorio di Biotechnologie Genetiche, avendo cura che tale identificazione non venga perduta o cancellata e che sia chiara e univoca sia sulla provetta contenente il campione che sulla provetta contenente un'aliquota dello stesso, da conservare (secondo Regolamento ENCI) per almeno 10 anni dalla data dell'avvenuto deposito del campione biologico.

I campioni devono pervenire corredati da 2 schede, di cui la prima debitamente firmata dal proprietario del cane, così come registrato sul certificato genealogico ENCI del cane stesso, e firmata e timbrata dal Veterinario che effettua il prelievo del campione biologico:

- Scheda n. 1 (Foglio di Accettazione): riporta il codice LOI ENCI, razza, nome, data di nascita e codice microchip dell'animale, dati relativi al proprietario del cane così come registrato sul certificato genealogico ENCI del cane stesso, indirizzo e numero di telefono del committente. Tale scheda deve essere firmata e timbrata dal Veterinario che effettua il prelievo del campione biologico. I campioni, in mancanza di timbro e/o della firma delle figure sopra indicate, non devono essere accettati per le analisi richieste. La scheda deve essere controfirmata e timbrata dal



 UNIVERSITA' DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE Biotecnologie Genetiche Registrazione e accettazione dei campioni	IO.4/PRO.2 Ed.02 Pagina 2 di 3
---	--

Responsabile Qualità del servizio (RQS) e deve riportare la data di arrivo del campione biologico in laboratorio.

- Scheda n. 2: riporta le istruzioni per il prelievo del campione biologico nel cane, le istruzioni per la consegna a mano o l'invio del campione biologico ed il riepilogo dei documenti da inviare al laboratorio contestualmente al campione biologico. La scheda riporta inoltre l'indirizzo completo del laboratorio nel formato e nelle dimensioni idonee ad essere ritagliato ed apposto sul pacco o sulla busta per l'invio del campione biologico.

Ogni campione da sottoporre ad analisi viene inserito su di un registro cartaceo riportante la numerazione progressiva relativa ai campioni biologici in ingresso in laboratorio per le analisi ENCI.

Il registro è organizzato in colonne riportanti per ciascun campione biologico in ingresso le seguenti informazioni:

- codifica progressiva identificante il campione in ingresso
- razza del cane
- codice Lot e microchip sottocutaneo
- nome e data di nascita del cane
- nome del Veterinario che ha eseguito il prelievo del campione biologico
- data di ricevimento del campione
- dati del proprietario
- data in cui è stato effettuato il prelievo del campione biologico
- eventuali informazioni aggiuntive sul campione
- tipologia di analisi richiesta

Nel caso di deposito dei campioni biologici, una copia dell'Attestato di avvenuto deposito deve essere inviata al cliente per posta elettronica, o consegnata direttamente come *Ricevuta*. Tale documento, predisposto, timbrato e firmato da RQS, deve riportare i dati identificativi del cane per il quale ENCI richiede al Proprietario il deposito dei campioni biologici presso uno dei Laboratori Accreditati, ed un *copy screen* relativo alla pagina della pratica del cane in oggetto, registrata sul Registro Anagrafico Nazionale ENCI al quale RQS accede con un'apposita password, rilasciata ufficialmente da ENCI e dalla quale si evincono i dati identificativi del cane, del proprietario, la data in cui è stato effettuato il deposito dei campioni biologici e il nome del laboratorio di Biotecnologie Genetiche.

Il *Foglio di accettazione* e l'Attestato di avvenuto deposito devono essere timbrati e firmati da RQS, classificati e conservati con un numero progressivo, che coincide con il codice identificativo del campione biologico, in un apposito schedario cartaceo annuale che costituisce l'archivio cartaceo delle analisi svolte annualmente per ENCI.

Nel contempo, un analogo archivio elettronico, organizzato per pratica cliente e per anno solare, riporta in ciascuna cartella il file PPT relativo all'Attestato di avvenuto deposito per ogni cane ed un file pdf relativo allo stesso attestato. Tale archivio viene conservato sul computer di RQS e contestualmente salvato sulla memoria esterna del Centro Serra assegnata al laboratorio. L'Attestato di avvenuto deposito deve essere inviato in formato pdf per email al cliente, o stampato e consegnato direttamente.



 UNIVERSITÀ DI PISA DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERinarie Biotecnologie Genetiche Registrazione e accettazione dei campioni	IO.4/PRO.2 Ed.02 Pagina 3 di 3
--	---

ACCETTAZIONE DEI CAMPIONI

RQS visiona tutta la documentazione, controlla la corrispondenza con quanto riportato sull'etichetta dei campioni e controlla che siano indicate le prove da eseguire. In mancanza di una documentazione completa, ad esempio nel caso in cui le informazioni necessarie per la registrazione dei campioni siano insufficienti, questi devono essere conservati nell'area "Campioni in attesa di accettazione" nel congelatore (-25°C) dedicato ai Campioni Analisti ENCI situato nel laboratorio. Contestualmente, RQS provvede a sollecitare l'invio della documentazione necessaria da parte del richiedente o a richiedere i chiarimenti utili all'accettazione dei campioni.

Una volta accettati, in attesa dell'esecuzione delle analisi i campioni devono essere conservati nell'area "Preparazione Campioni" all'interno del congelatore (-25°C) situato nel laboratorio.

In presenza di campioni che si presentino in condizioni non idonee, ad esempio campioni danneggiati o matrici non idonee per le analisi richieste, questi non vengono accettati e RQS provvede a contattare il richiedente per concordare le azioni successive. Contestualmente, tali campioni vengono smaltiti a cura di RQS in ottemperanza alle vigenti disposizioni legislative.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

La conservazione dei campioni e dei residui dei campioni analizzati è responsabilità di RQS. La conservazione dei residui dei campioni è prevista per un periodo di almeno 10 anni a partire dalla data di accettazione, secondo le precauzioni previste dal regolamento ENCI. Per tale periodo, i campioni devono essere posti nell'apposita area "Campioni processati" all'interno del congelatore (-25°C) situato nel laboratorio.

SMALTIMENTO DEI CAMPIONI

Dopo il periodo di tempo stabilito per la loro conservazione, i residui di campioni analizzati vengono smaltiti a cura di RQS, in ottemperanza alle vigenti disposizioni legislative.