

Biotype[®] **Template Files** für Genotyper[®] Software

Einleitung

Biotype[®] Auswertevorlagen (Template Files) sind Software - Komponenten für die Auswertung von GeneScan[®] Analysedaten mit der Genotyper[®] Software. Biotype[®] Template Files gelten für ABI PRISM[®] Ein- und Mehrkapillargeräte der Firma Applied Biosystems.

Die Genotyper[®] Software mit den Biotype[®] Template Files ordnet den DNA-Fragmenten anhand der Fragmentlänge die Allelbezeichnungen der jeweiligen STR Loci zu. Optional werden zusätzlich die entsprechenden Fragmentlängen der Peaks in Basenpaaren oder die Peakhöhen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angezeigt. Diese Daten (Genotypen) können in Tabellenform ausgegeben und exportiert werden.

Biotype[®] Template Files gibt es für alle STR-Testkits:

- ab Genotyper[®] Version 3.7 (Windows[®])
- ab Genotyper[®] Version 2.5 (Macintosh[®])

Anmerkung

Seit dem 1. Juni 2004 können Genotyper und GeneScan Software bei Applied Biosystems nicht mehr gekauft werden. Der technische Support endete 6/2009.

Die nachfolgende Beschreibung wurde am Beispiel einer Analyse mit dem Mentype[®] Nonaplex I (6-FAM/HEX/NED) Testkit am ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer erstellt. Es wurde einheitlich der DNA Längenstandard 550 (ROX) verwendet. Die Analysen wurden mit der Genotyper[®] Software Version 3.7 für Windows[®] und dem Mentype[®]

Nonaplex I Template File durchgeführt.

Allgemeine Anweisungen zur Probenauswertung können dem *Genotyper[®] Software User's Manual* entnommen werden.

Bestellinformation

Biotype[®] **Template Files**
für Macintosh[®] und Windows[®]

CD-ROM

Artikelnummer 49-10900-0000

Inhaltsverzeichnis

1	Einrichtung am Auswertungsrechner.....	3
2	Kalibrierung mit Allelleitern.....	3
3	Auswertung der Analysedaten	4
4	Macros für Biotyper [®] Testkits	5
A.	Calibrate Ladder (Strg + 0)	7
B.	Label 20% Filter/incl. bp/incl. peak height (Strg + 1/2/3)	8
C.	Label 10% Filter (Strg + 4)	11
D.	Blue/Green/Yellow Panels (Strg + 5/6/7)	13
E.	Horizontal Table for 2 Alleles (Strg + 8)	14
F.	Vertical Table for 10 Alleles (Strg + 9)	15
G.	Calculate Category Offsets.....	15
5	Änderung der Kategorien	16
6	Fehlersuche	17

1 Einrichtung am Auswertungsrechner

Biotype[®] Auswertevorlagen (Template Files) für Genotyper[®] Software finden Sie auf unserer Homepage www.biotype.de zum Download. Auf Anfrage senden wir Ihnen kostenfrei eine CD-ROM zu. Die Biotype[®] Template Files sollten vor der erstmaligen Nutzung der Genotyper[®] Software unverändert auf dem lokalen Computer (Windows[®] oder Macintosh[®]) in einem Ordner gespeichert werden.

z. B. für den Testkit Mentype[®] Nonaplex I
Mentype_Nonaplex I_v3c (oder aktuelle Version)

Für die Auswertung mit Macintosh[®] Computern empfehlen wir aus Konvertierungsgründen die Verwendung der CD-ROM.

2 Kalibrierung mit Allelleitern

Das Arbeiten mit der Genotyper[®] Software erfolgt mit zusammengehörigen Analysedaten, d. h. den gemessenen DNA-Proben und Allelleitern innerhalb einer gta-Datei. Zur Auswertung der DNA Proben muss eine Kalibrierung mit einem aktuellen Lauf der Allelleiter (Allelic Ladder) erfolgen. Jeweils am Anfang und am Ende der DNA Proben sollte die Allelleiter des verwendeten Testkits analysiert werden. Zur Kalibrierung werden die gemessenen Ist-Fragmentlängen der Allelleiter automatisch als Soll-Werte in die Kategorien der Auswertevorlage übertragen. Die Kalibrierung kann immer nur auf Basis **eines** aktuellen Laufes der Allelleiter erfolgen.

Kalibrierung an Mehrkapillargeräten

Um eine sichere Allelzuordnung am Mehrkapillargerät zu gewährleisten, sollten mehrere Allelleitern auf verschiedenen Kapillaren mitlaufen. Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten der PCR-Produkte an Mehrkapillargeräten stark beeinflussen und bei zu geringer Temperatur zum Auftreten von Doppelpeaks (Split Peaks) führen. Unter Umständen nimmt die Temperatur auch Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der Fragmente. Bitte achten Sie darauf, dass die vom Gerätehersteller empfohlene Arbeitstemperatur eingehalten wird.

Systemparameter

Unterschiedliche Analysegeräte, DNA Längenstandards oder Polymere können zu unterschiedlichen Fragmentlängen führen. Deshalb müssen alle zusammengehörigen DNA Proben und Allelleitern mit den gleichen Systemparametern gemessen werden.

3 Auswertung der Analysedaten

- Auswertevorlage des Biotyper[®] Testkits öffnen (Genotyper[®] Software öffnet sich)
- Daten importieren: **File** → **Import** → **From GeneScan File**
- GeneScan Analysis Data Files auswählen: **Add Sample Files** → **Add** → **Finish**
- Data Files erscheinen im oberen Teil des Fensters
- Für den Import die Probenfarben des Biotyper[®] Testkits und die rote Farbe für den DNA Längenstandard auswählen (z. B. **B, G, Y, R**):
Edit → **Set Preferences** → **Import Colors**
- Macro markieren oder Doppelklick auf das jeweilige Macro (links unten im Fenster) führt das Macro aus: **Macro** → **Run Macro**

Anmerkung

Vor der Analyse der Daten muss zuerst das Macro **Calibrate Ladder** ausgeführt werden (siehe Kapitel 4A).

Allgemeine Vorgehensweise bei der Auswertung

1. Prüfen des Längenstandards (Size Standard)
2. Prüfen der Allelleiter (Allelic Ladder)
3. Prüfen der Positivkontrolle
4. Prüfen der Negativkontrolle
5. Probendaten auswerten

4 Macros für Biotype[®] Testkits

A. Calibrate Ladder	Strg + 0
B. Label 20% Filter	Strg + 1
Label 20% Filter incl. bp	Strg + 2
Label 20% Filter incl. peak height	Strg + 3
C. Label 10% Filter	Strg + 4
D. Blue Panels	Strg + 5
Green Panels	Strg + 6
Yellow Panels	Strg + 7
E. Horizontal Table for 2 Alleles	Strg + 8
F. Vertical Table for 10 Alleles	Strg + 9
G. Calculate Category Offsets	

Das Macro Calibrate Ladder muss immer verwendet werden, alle weiteren Auswertevorlagen sind optional.

Längenstandard

SST-ROX

Um die korrekte Längenzuordnung der auszuwertenden Proben zu prüfen, klicken Sie auf die Farbe des DNA Längenstandards (rotes Icon) **[R]** in der linken oberen Ecke der Genotyper[®] Software. Nun lassen sich die roten Panel des DNA Längenstandards aller Proben im Plot Window anzeigen. Vergleichen Sie die Fragmentlängen der Proben mit denen des **DNA Längenstandard 550 (ROX)**: Es sollten **50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 und 550 bp** angezeigt werden. Bei abweichenden Fragmentlängen ist eine weitere Analyse mit der GeneScan[®] Software durchzuführen. Falls notwendig, ist eine neue Definition des DNA Längenstandards in der GeneScan[®] Software zu erstellen.

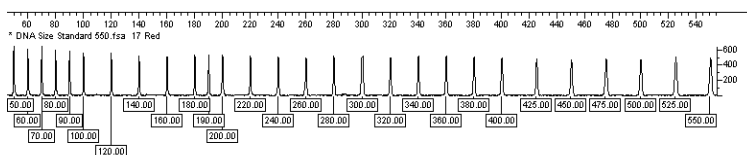


Abb. 1 Elektropherogramm des DNA Längenstandard 550 (ROX), Fragmentlängen in bp

SST-BTO

Für Biotype Testkits im 5 Farbbassay mit den Fluoreszenzfarben 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO (=Biotype Matrix BT5) wird ein Längenstandard im orangefarbenen Panel benötigt (orangefarbenes Icon **[O]**). Hierfür muss der DNA Längenstandard 550 (BTO) verwendet werden.

A. Calibrate Ladder (Strg + 0)

Beschreibung

- Zur Kalibrierung der Auswertevorlage mit einem aktuellen Lauf der Allelleiter
- Sofern das Template File gespeichert wird, kann die erzeugte Kalibrierung für alle mit dieser Allelleiter gemessenen DNA Proben verwendet werden
- Im Anschluss an die Kalibrierung wird automatisch das Macro **Label 20% Filter** ausgeführt

Kennzeichnung der Allelleiter

Alle Farben der importierten Allelleiter müssen vorher im entsprechenden Fenster (**Views** → **Show Dye/Lanes Window**) als Allelleiter definiert werden. Dazu muss jede Farbe der Allelleiter das Wort „**ladder**“ im Textfeld **Sample Info** erhalten.

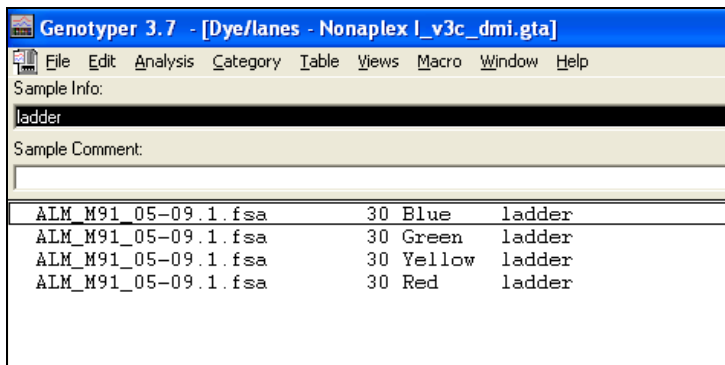


Abb. 2 Tragen Sie für jede Farbe der Allelleiter das Wort „**ladder**“ im Feld **Sample Info** ein

Anmerkung

Peaks, die von der GeneScan[®] Software nicht erkannt werden, kann die Genotyper[®] Software auch **nicht** erkennen!

Kontrollen

Zur Prüfung der richtigen Allelzuordnung vergleichen Sie bitte die Allele der Allelleiter sowie der Kontroll-DNA des Testkits mit der aktuellen Gebrauchsanleitung.

B. Label 20% Filter/incl. bp/incl. peak height (Strg + 1/2/3)

Beschreibung

- Zur Auswertung von Proben **einer** DNA, nicht geeignet für DNA Mischproben
- Bezeichnung (Label) aller relevanten Peaks
- Macro **Label 20% Filter**: Die Peaks werden mit dem zugehörigen Allel bezeichnet
- Macro **Label 20% Filter incl. bp**: Die Peaks werden mit dem zugehörigen Allel sowie zusätzlich mit ihrer Fragmentlänge in Basenpaaren bezeichnet
- Macro **Label 20% Filter incl. peak height**: Die Peaks werden mit dem zugehörigen Allel sowie zusätzlich mit ihrer Peakhöhe in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bezeichnet
- Im sich automatisch öffnenden Plot-Fenster werden angezeigt:
 - DNA Proben
 - Allelleiter
 - DNA Längenstandard (ROX), wenn importiert

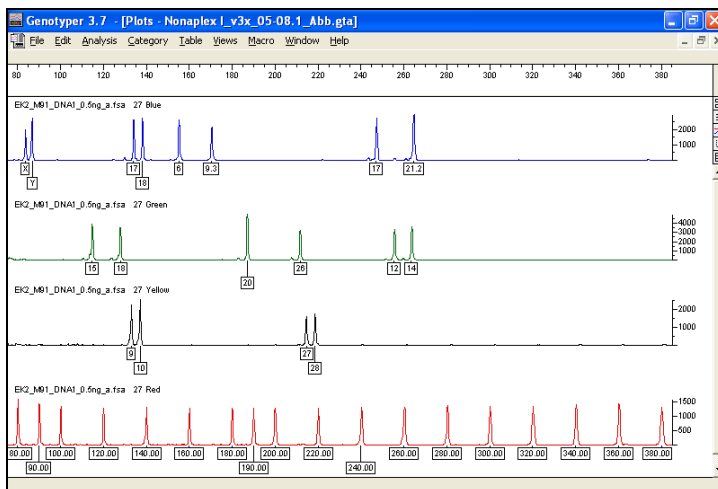


Abb. 3 Plot Window nach Ausführung des Macros **Label 20% Filter**

Bezeichnung aller relevanten Peaks

- Im Macro **Label 20% Filter** werden Peakbezeichnungen unter 20% der Höhe des höchsten Peaks der jeweiligen Kategorie (STR-Loci) nicht angezeigt. Zur Veränderung des voreingestellten 20% Filters siehe **Ändern der Filterwerte** (S. 12)
- Filteroptionen, um Stutterpeaks und MinusA Peaks zu vermeiden, sind in die Macros bereits integriert
- Nicht erkannte Peaks im Allelbereich erhalten die Bezeichnung „**allele?**“. Diese Label sind zu prüfen und können durch Anklicken entfernt werden (siehe „**allele?**“ auf S.18). Hierzu ggf. Fenster verkleinern und erneut anklicken

Erstellung neuer Peakbezeichnungen

Um die Peakbezeichnungen im Macro zu ändern, führen Sie folgende Schritte aus:

- Öffnen des Template Files: **File** → **Unlock**
- Klicken auf das zu ändernde Macro „Label...“
- Öffnen des Step Fensters: **View** → **Show Step Window**

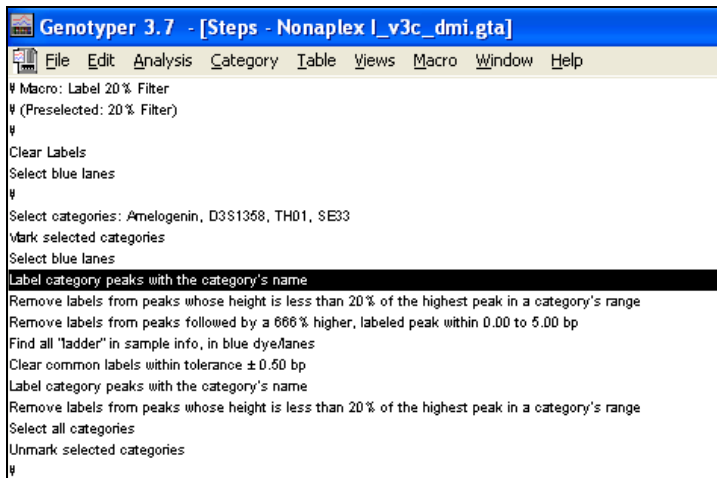


Abb. 4 Step Window des Macros **Label 20% Filter**

- Markieren Sie im **Step Window** die Zeile, die Sie ändern möchten (siehe **Label category peaks...** Abbildung 4)
- Editieren Sie diesen Schritt: **Macro** → **Edit Step**

- In dem nun erscheinenden Fenster auf die gewünschte Peakbezeichnung (z. B. size in bp, peak height, peak area) klicken und die Änderung mit **Replace** sichern

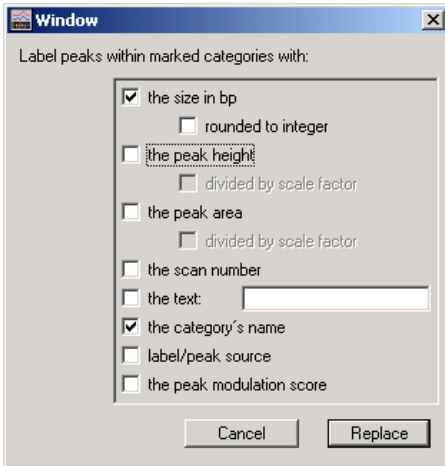


Abb. 5 Fenster im Step Window zum Editieren der Peakbezeichnungen

- Verfahren Sie analog bei den weiteren Kategorien
- Nach ausgeführten Änderungen schließen Sie das Template File mit **File** → **Lock** und speichern die Änderung: **File** → **Save as**

Anmerkung

Das Macro Label 20% Filter sollte **nicht** bei DNA Mischproben angewendet werden. Hierfür müssen vom Analyzelabor eigene Filterwerte definiert werden. Alternativ kann auch das Macro **Label 10% Filter** verwendet werden.

C. Label 10% Filter (Strg + 4)

Beschreibung

- Zur Auswertung von Spuren bzw. DNA Mischproben, z. B. für die forensische Fallarbeit
- Die Peaks werden mit dem zugehörigen Allel bezeichnet
- Im sich automatisch öffnenden Plot-Fenster werden angezeigt:
 - DNA Proben
 - Allelleiter
 - DNA Längenstandard (ROX), wenn importiert

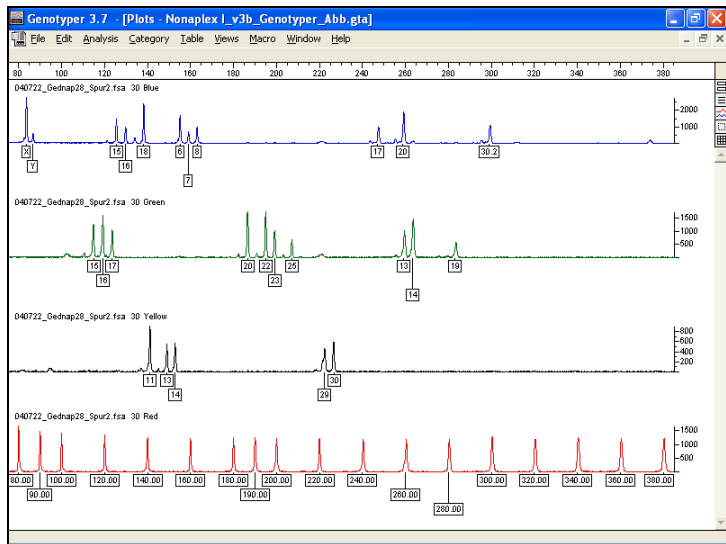


Abb. 6 Plot Window nach Ausführung des Macros **Label 10% Filter**

Grundeinstellung zur verbesserten Peakerkennung

- Das Macro **Label 10% Filter** bezeichnet alle Peaks über 10% der Peakhöhe des höchsten Peaks der jeweiligen Kategorie (voreingestellter Filter 10%)
- Filteroptionen, um Stutterpeaks und MinusA Peaks zu vermeiden, sind in die Macros bereits integriert

Ändern der Filterwerte

Um die untere Grenze der Peakerkennung (Voreinstellung: 20% Filter) im Genotyper[®] Macro zu ändern, führen Sie folgende Schritte aus:

- Öffnen des Template Files: **File** → **Unlock**
- Klicken auf das zu ändernde Macro („Label...“)
- Öffnen des Step Fensters: **Views** → **Show Step Window**

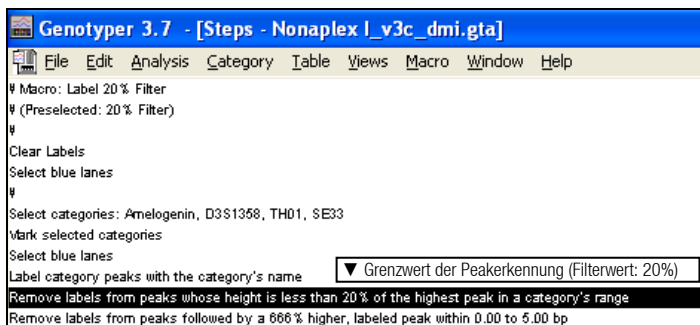


Abb. 7 Step Window des Macros **Label 20% Filter**

- Zur besseren Erkennung der Kategorien (STR-Loci) wie z. B. Amelogenin, D3S1358, TH01, SE33 markieren Sie die Zeile **Remove labels from...** (siehe Abbildung 7)
- Editieren Sie diesen Schritt: **Macro** → **Edit Step**

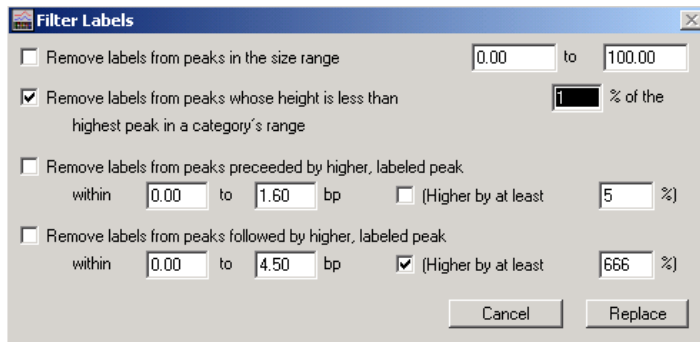


Abb. 8 Fenster im Step Window zum Ändern der Filterwerte

- Tragen Sie im Fenster **Filter Labels** den Prozentwert ein, der als untere Grenze festgelegt werden soll (siehe schwarz markiertes Feld in Abbildung 8)
- Sichern Sie die Änderung mit **Replace**, schließen Sie das Template File mit **File** → **Lock** und speichern neu: **File** → **Save as**

D. Blue/Green/Yellow Panels (Strg + 5/6/7)

Beschreibung

- Dient dem Vergleich von DNA Proben mit der dazugehörigen Allelleiter
- Zeigt die zuletzt erstellten Peakbezeichnungen aus Macro „Label...“ an (Kapitel B+C)
- Zur vereinfachten Zuordnung kann der entsprechende Skalierungsbereich vergrößert werden: **Views** → **Zoom** → **Zoom To** (z. B. 150-190 bp)

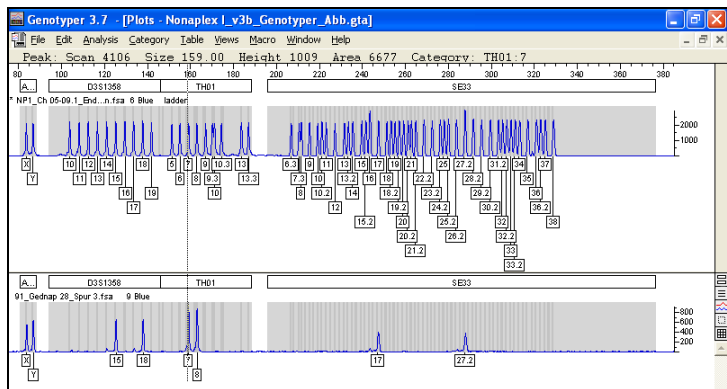


Abb. 9 Plot Window nach Ausführung des Macros **Blue Panels** mit Allelleiter und DNA Probe

Bezeichnung der Kategorien (STR-Loci)

Die Bezeichnung der Kategorien (STR-Loci) über einem Farbpanel kann durch die Einstellung des **Plot Windows** erreicht werden. Hierfür muss ein Haken bei der Einstellung **Category boundaries** gesetzt werden (**Views** → **Plot Options** → **Plot Window, Upper Panel** bzw. **Plot Window, Lower Panel**). Im **Plot Window, Upper Panel** wird die Allelleiter im oberen Teil des Fensters fixiert. Im **Plot Window, Lower Panel** werden die DNA Proben im unteren Teil des Fensters dargestellt. Bei **verschiedenen** Farbpanels untereinander können die Kategorien (STR-Loci) z. B. Amelogenin, D3S1358, TH01, SE33 von der Genotyper[®] Software **nicht** mehr bezeichnet werden.

E. Horizontal Table for 2 Alleles (Strg + 8)

Beschreibung

- Zur Auswertung von Proben **einer** DNA z. B. für eine DNA Datenbank
- Dieses Macro erstellt Tabellen nach Ausführung der Macros „Label...“
- Zeigt die Allelbezeichnungen von zwei Peaks je Kategorie (STR-Locus) nebeneinander an und erzeugt hieraus eine horizontale Tabelle, bei der die Auswertung jeder Probe in einer Zeile erfolgt
- Bei nur einem Peak (Homozygotie) je Kategorie erscheint die Allelbezeichnung doppelt in der Tabelle (Ausnahme: X- und Y-chromosomale Testkits)
- Zur Unterscheidung der einzelnen DNA Proben muss das Feld **Sample Info** in jeder Probenfarbe mit einer eindeutigen Bezeichnung für jede Probe ausgefüllt werden:

Views → Show Dye/Lanes Window

- Um die aktuelle Allelbezeichnung der Peaks in die Tabelle zu übernehmen, verwenden Sie **Table** → **Update Table**. Fehlbezeichnungen z. B. durch Überstrahlungen zwischen den Farbkanälen („Pull-up Peaks“) können manuell weggeklickt werden

Sample Info	Amelogenin 1	Amelogenin 2	D3S1358 1	D3S1358 2	TH01 1	TH01 2	SE33 1	SE33 2	vWA 1
DNA1	X	Y	17	18	6	9.3	17	21.2	15
DNA318	X	Y	15	18	6	8	15	30.2	17
DNA319	X	Y	14	17	9.3	9.3	19	30.2	17
DNA320	X	X	14	15	8	9.3	19	29.2	17
DNA321	X	Y	15	17	6	9.3	23.2	26.2	17
DNA322	X	Y	16	18	7	9.3	22.2	27.2	14

Abb. 10 Tabellenausgabe nach Ausführung des Macros **Horizontal Table for 2 Alleles**

Export von Tabellen

Zum Export der Tabelle in eine Microsoft® Excel® Datei (deutsch) führen Sie folgende Schritte aus:

- **Table** → **Export to File** (beim Speichern die Erweiterung „.xls“ anhängen)
- Excel® Software öffnen, Tabelle einladen und im Konvertierungsablauf in Schritt 3 folgende Änderung vornehmen:

Schritt 3

Datenformat der Spalten → „weitere“

Dezimaltrennzeichen → . (Punkt)

1000er Trennzeichen → (Leerzeichen)

F. Vertical Table for 10 Alleles (Strg + 9)

Beschreibung

- Zur Auswertung von Spuren bzw. Mischproben verschiedener DNAs
- Dieses Macro erstellt Tabellen nach Ausführung der Macros „Label...“
- Zeigt die Allelbezeichnungen von bis zu zehn Peaks an und erzeugt hieraus eine vertikale Tabelle, bei der die Auswertung jeder Kategorie (STR-Locus) in einer Zeile vorgenommen wird, z. B. Nonaplex: alle Kategorien x 10 Allele
- Neben dem Feld **Sample Info** wird auch der Dateiname (**File Name** - Bezeichnung der Probe) angezeigt
- Bei nur einem Peak (Homozygotie) je Kategorie erscheint die Allelbezeichnung doppelt in der Tabelle (nicht bei X- und Y-chromosomalen Testkits)
- Um die aktuelle Allelbezeichnung der Peaks in die Tabelle zu übernehmen, verwenden Sie bitte **Table** → **Update Table**. Störungen in der Elektrophorese, z. B. durch Überstrahlungen zwischen den Farbkanälen „Pull-up Peaks“, können manuell weggeklickt werden

File Name	Sample Info	Category	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8
W91_Spur1.fsa	Spur1	AmeIogenin	X	Y						
W91_Spur1.fsa	Spur1	D3S1358	14	17						
W91_Spur1.fsa	Spur1	TH01	6	8	9 3					
W91_Spur1.fsa	Spur1	SE33	24.2	27.2	28.2					
W91_Spur1.fsa	Spur1	vWA	15	18	20					
W91_Spur1.fsa	Spur1	FGA	19	21	22					
W91_Spur1.fsa	Spur1	D18S51	14	15	16	17				
W91_Spur1.fsa	Spur1	D8S1179	10	13	14					
W91_Spur1.fsa	Spur1	D21S11	28	29	32.2					

Abb. 11 Tabellenausgabe nach Ausführung des Macros **Vertical Table for 10 Alleles**

G. Calculate Category Offsets

Hierunter finden Sie die Macros zur Kalibrierung der einzelnen Kategorien. Diese Macros werden für „Calibrate Ladder“ verwendet und sollten nicht einzeln ausgeführt werden.

5 Änderung der Kategorien

- Template File des Biotype® Testkits öffnen, Genotyper® Software öffnet sich
- Schutz des Template Files (erkennbar am Schloss-Symbol in der linken unteren Ecke des Fensters) aufheben: **File** → **Unlock**
- Kategorien öffnen: **Views** → **Show Categories**
- Zu veränderndes Allel aus Tabelle wählen: **Category** → **Edit Category**
- Ändern von Allelmerkmalen (Toleranzbereich, Fragmentlänge):
Replace → **File** → **Save**

Anmerkung

Neue Kategorien z. B. durch neu gefundene Punktallele (SE33-20.1 etc.) können auf diese Weise zugefügt werden. Der Toleranzbereich für alle Kategorien sollte ± 0.45 bp betragen. Diese neuen Kategorien werden jedoch **nicht** bei der automatischen Kalibrierung der Allelleiter mit dem Macro **Calibrate Ladder** an die aktuellen Fragmentlängen der Allelleiter angepasst.

Für eigenständige Änderungen der Template Files übernimmt die Biotype Diagnostic GmbH als Hersteller der Testkits keine Haftung. Die aktuellen Versionen stehen auf der Homepage www.biotype.de zum Download bereit.

6 Fehlersuche

Beobachtung

Fehlermeldung beim Start der Genotyper Software "Could not start the application because there is not enough memory."
→ Zum Starten der Anwendung ist nicht ausreichend Speicher vorhanden.

Das Template File lässt sich nicht öffnen.

Fehlermeldung bei der Analyse "Could not complete your request because the labelled peak could not be found." → Ihre Anfrage kann nicht ausgeführt werden, da ein Peak der Allelleiter nicht erkannt wird (der Peak wird in den Kategorien markiert).

Mögliche Ursache

Speicherfehler, der Windows Computer hat zuviel Speicher. Seit dem 1. Juni 2004 können Genotyper und GeneScan Software bei Applied Biosystems nicht mehr gekauft werden. Der technische Support endete 6/2009.

Genotyper[®] Software hat **nicht** die Macintosh[®] Version 2.5 bzw. **nicht** die Windows[®] Version 3.7.

Die Genotyper[®] Software ist **nicht** auf dem lokalen Computer installiert.

Die Dateien (Template Files) oder die CD-ROM wurden beschädigt.

Durch Störungen in der Elektrophorese wird ein zusätzliches Signal als Peak der Allelleiter erkannt. Werden Peaks der Allelleiter falsch benannt, kann diese Allelleiter **nicht** für die Auswertung verwendet werden.

Ein Peak der Allelleiter liegt unter dem Peakerkennungswert (50-200 RFU) der verwendeten GeneScan[®] Analysis Parameter und wird **nicht** als Peak erkannt.

Ein Peak der Allelleiter wird nicht erkannt, da er **nicht** in dem von der Software erwarteten Bereich (in bp) liegt.

Abweichende Fragmentlängen durch ungeeigneten Längenstandard.

Lösung

Geeigneten Computer verwenden. Eventuell arbeitet eine Windows Computer mit weniger als 1 GB Speicher mit der Genotyper software.

Genotyper[®] Software aktualisieren (Die alte Macintosh[®] Version 2.1 kann mit einem kostenlosen Update auf die Version 2.5 gebracht werden. Download von der Homepage www.appliedbiosystems.com).

Installieren Sie die Genotyper[®] Software auf dem lokalen Computer.

Laden Sie die Dateien erneut von der Homepage www.biotype.de herunter oder ordern Sie eine neue CD-ROM.

Verwenden Sie eine andere Injektion der Allelleiter. Die analysierten Längen des internen ROX-Standards (in bp) der Allelleiter-Datei sollten zuerst überprüft werden.

Die Allelleiter muss erneut in erhöhter Konzentration auf das Analysegerät geladen werden. Alternativ kann die Allelleiter- Datei mit einem geringeren Peakerkennungswert (**Peak Detection**) in der GeneScan[®] Analysis Software neu analysiert werden.

Zuerst sollte die Fragmentlänge (in bp) des **ersten Allels** einer Farbe der Allelleiter mit dem entsprechenden Wert in den Kategorien verglichen werden, dann die weiteren Allele.

Für Biotype[®] Testkits **immer** den internen DNA Längenstandard 550 verwenden!

Beobachtung

Fehlermeldung bei der Analyse "Could not complete your request because no dye/lanes are selected." → Ihre Anfrage kann nicht ausgeführt werden, da keine Farben bzw. Dateien ausgewählt sind.

In den DNA Proben werden viele Peaks mit "**allele?**" benannt.

Punktallele, d. h. Allele mit mindestens 1 bp Abstand zum nächsten ganzzahligen Allel (z. B. TH01 9.3/10) wurden nicht erkannt.

Mögliche Ursache

Die Datei der Allelleiter wurde nicht geladen.

Die Datei der Allelleiter wurde nicht erkannt.

Es sind nicht alle 4 Farben importiert worden.

Luftblasen in der Kapillare führen zu Überstrahlungen in allen Farbkanälen („Spikes“). Dadurch kommt es zu Fehlbezeichnungen der Allele.

Zu hohe Intensitäten am Analysegerät. Liegen die Peakhöhen der DNA Proben außerhalb des linearen Detektionsbereichs (>4000 RFU /ABI310; >5000 RFU /ABI3130) kann es zu erhöhten Stutterpeaks, geteilten Peaks (split peaks) und Artefakten kommen.

Der DNA Längenstandard 550 (ROX oder BTO) wurde nicht richtig definiert oder erkannt.

Daten von verschiedenen Geräten z. B. ABI 310 und ABI 3130 wurden in **einer** gta-Datei abgelegt.

Die Punktallele wurden in der GeneScan® Analyse nicht getrennt.

Lösung



Biotype® Allelleiter Datei importieren.

In **Views** → **Show Dye/Lanes Window** muss in jeder Farbe der Allelleiter im Textfeld **Sample Info** das Wort „**ladder**“ stehen.

In **Edit** → **Set Preferences - Import Colors** alle 4 Farben anwählen und neu importieren.

Zur Bestätigung der Ergebnisse Elektrophorese wiederholen.

Die Injektionszeit auf bis zu 1 Sekunde verringern oder weniger PCR-Produkt zur Analyse einsetzen oder weniger DNA in der PCR einsetzen.

Klicken Sie auf das Icon  für ROX oder  für BTO in der linken oberen Ecke der Genotyper Software und lassen sich die roten oder orangen Fragmente aller DNA Proben im Plot Fenster anzeigen.

Daten von verschiedenen Geräten immer in verschiedenen gta-Dateien ablegen.

Prüfen der Einstellungen der GeneScan® Analyse Parameter. Evtl. Wert für die **Peak Window Size** auf 11 pts verringern und speichern! Anschließend die DNA Proben mit den veränderten Analyseparametern neu analysieren.

Warenzeichen

Menotype® ist ein Warenzeichen der Biotype Diagnostic GmbH. 6-FAM, HEX, NED, ROX, ABI PRISM®, GeneScan®, Genotyper® und Applied Biosystems sind Warenzeichen von Life Technologies. Macintosh® ist ein Warenzeichen von Apple Computers, Inc. Windows® und Excel® sind Warenzeichen der Microsoft Corporation.