

Animaltype **Pig** PCR Amplification Kit

Eigenschaften und Leistungen

Animaltype **Pig** ist das einzige kommerziell erhältliche Testkit zur Genotypisierung beim Schwein. Es umfasst 11 aussagekräftige Tetranukleotidmarker (siehe Tab. 1). Die kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit (cEP) dieser STR-Systeme ist bei den häufigsten deutschen Schweinerassen "Deutsches Edelschwein" (DE), "Deutsche Landrasse" (DL) und "Pietrain" (Pi) gleichwertig oder besser als bei den bisher für Deutschland und Österreich empfohlenen 15 Dinukleotid-STRs (siehe Tab. 2).

Tabelle 1. Die Animaltype Pig Tetranukleotid STR-Marker

| Locus* | Chromosomale Kartierung |
|---------------|--------------------------------|
| 387A12F | 12p14-15 |
| S0655 | 7p11 |
| SBH1 | 1p13 |
| SBH2 | 3p16-17 |
| SBH4 | 6q35 |
| SBH10 | 9p11-13 |
| SBH13 | 13q46-47 |
| SBH18 | 16q23 |
| SBH19 | 17q12-14 |
| SBH20 | 18q13-23 |
| SBH22 | Xp24 |
| SBH23 | X, Y (gonosomal) |

* Manuskripte zur Publikation der Loci SBH1-23 in Vorbereitung; 387A12F siehe Kiuchi et al. (2002); S0655 siehe Renard et al. (2001)

Tabelle 2. Kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeiten von STR-Markern

"Deutsches Edelschwein" (DE), "Deutsche Landrasse" (DL) und "Pietrain" (Pi)

| Multiplex | cEP gesamt | cEP DL | cEP DE | cEP Pi |
|--------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|
| 11-4- STRs Biotype | 0,9992 | 0,9997 | 0,9987 | 0,9998 |
| 15-2- STRs* | 0,9965 | 0,9965 | 0,9988 | 0,9978 |

* Nechtelberger et al. (2001)

Animaltype **Pig** besitzt folgende technische Vorteile:

Die Genotypisierung mit Tetranukleotidmarkern durch das Animaltype **Pig** Testkit garantiert eindeutig ersichtliche Ergebnisbanden (siehe Abb. 1). Darüber hinaus enthält das Testkit einen genetischen Marker (Amelogenin, SBH23) zur Geschlechtsbestimmung. Der Test ist ferner mit einer Allelleiter ausgestattet, welche eine Standardisierung zwischen verschiedenen Testlaboratorien ermöglicht.

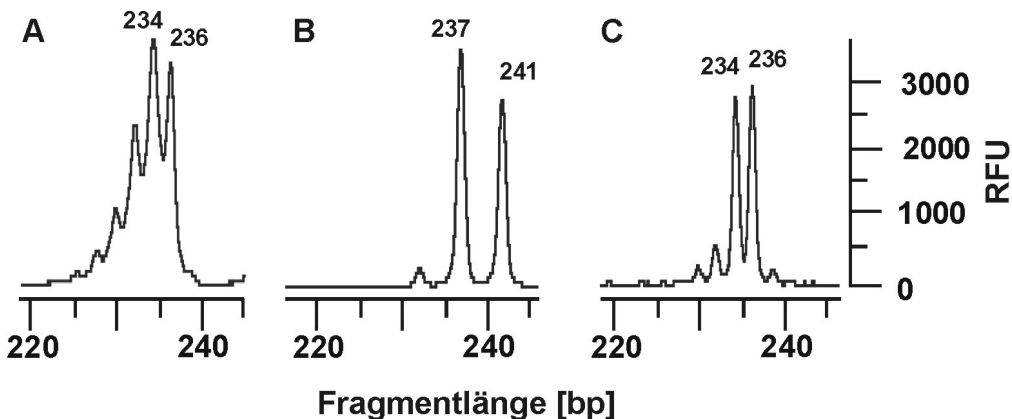


Abb. 1 Die Elektropherogramme zeigen den Vorteil von Tetranukleotid-STRs im Vergleich zu Dinukleotid-STRs. **A:** S0005 (Dinukleotid-STR); **B:** SBH13 (Tetranukleotid-STR); **C:** SBH7 (Tetranukleotid-STR mit einer 2 Basenpaar-Insertion; nicht im Testkit enthalten). RFU: relative Fluoreszenzeinheiten

Produktbeschreibung

Das Animaltype **Pig** PCR Amplification Kit ist eine Multiplex-Anwendung für elf polymorphe Short Tandem Repeat (STR) Loci zur Beurteilung der genetischen Abstammung und einem genetischen Marker zur Geschlechtsbestimmung des Schweins (*Sus scrofa*). In einem PCR-Ansatz werden die STR-Loci **387A12F**, **S0655**, **SBH1**, **SBH2**, **SBH4**, **SBH10**, **SBH13**, **SBH18**, **SBH19**, **SBH20** und **SBH22** sowie der Geschlechtsmarker **SBH23** simultan amplifiziert.

Das Testkit wurde speziell für die schnelle und zuverlässige Erstellung von DNA-Befunden aus Blutproben bzw. Gewebeproben (insbesondere Ohrknorpel) entwickelt. Jeweils ein Primer der entsprechenden Primerpaare ist mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM** (**SBH2**, **SBH18**, **SBH4** und **S0655**), **HEX** (**SBH23**, **SBH20**, **SBH1** und **SBH10**) bzw. **NED** (**SBH13**, **387A12F**, **SBH22** und **SBH19**) markiert. Bei der Zusammenstellung des Primergemisches wurde besonders auf eine ausgewogene Signalintensität der einzelnen DNA-Systeme geachtet.

Die Nachweisgrenze für das Animaltype **Pig** Testkit liegt bei **1 ng genomischer DNA**. Wir empfehlen den Einsatz von **1-10 ng DNA**.

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurden am GeneAmp[®] 9700 Thermocycler, ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer und ABI PRISM[®] 3100/3130 Genetic Analyzer durchgeführt.

Anwendungsmöglichkeiten

Das Testkit kann für folgende Anwendungen verwendet werden:

- Herkunftsnachweis entsprechend der EU-Verordnung
- Abstammungsnachweis im Rahmen von Zuchtkontrolluntersuchungen
- Kontrolle des Inzuchtstatus von Herdbuchpopulationen

Tabelle 3. Locus-spezifische Informationen für Animaltype Pig

| Locus | GenBank® Accession | Repeatmotiv des Referenzalleles | Referenz Allel | Allel- Bereich |
|--------------|-------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| 387A12F | AB059041 | [TTCT] ₂ CT [TTCT] ₁₉ | 21 | 9-21 |
| S0655 | AJ251829 | [GGAA] ₁₂ | 12 | 5-22 |
| SBH1 | eingereicht | [CTTT] ₁₃ | 13 | 7-18 |
| SBH2 | eingereicht | [AGAA] ₂₄ AA [AGAA] | 25 | 6-34 |
| SBH4 | eingereicht | [GAAA] ₂ GGAA [GAAA] ₂ A [GAAG] ₇ [GAAA] [GAAG] [AAAG] [AGAG] ₅ [AAAG] ₆ AA [AAAG] ₄ A [AAAG] ₃ AA [AAAG] ₄ A [AAAG] ₂₁ AG [AAAG] ₃ AGAG [AAAG] ₂ | 64 | 47.3-66.1 |
| SBH10 | eingereicht | [TAGA] ₁₅ [CAGA] ₁₂ [TAGA] ₇ TACA [TAGA] TACA [TAGA] TACA [TAGA] ₂ TACA [TAGA] ₂ TACA [TAGA] ₂ CAAA | 48 | 31-50 |
| SBH13 | eingereicht | [TATC] ₁₅ | 15 | 8-18 |
| SBH18 | eingereicht | [AGGA] ₁₅ | 15 | 9-23 |
| SBH19 | eingereicht | [GTCT] ₄ [ATCT] ₁₀ | 14 | 10-16 |
| SBH20 | eingereicht | [CTTT] ₁₄ CTTC [CTTT] ₂ CTTC [CTTT] ₂ CTTC [CTTT] ₃ | 24 | 19-49 |
| SBH22 | eingereicht | [ATAG] ₆ ATG [ATAG] ₁₁ ATG [ATAG] ₃ | 20 | 18-28 |
| SBH23 Y | eingereicht | - | | |
| SBH23 X | eingereicht | - | | |

Tabelle 3 zeigt die STR-Loci mit ihren Repeatmotiven und Allelen. Die Nomenklatur entspricht den Leitlinien der International Society for Forensic Genetics (ISFG; Bär et al., 1997).

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurden am GeneAmp® 9700 Thermocycler, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer und ABI PRISM® 3100/3130 Genetic Analyzer sowie ABI PRISM® 377 DNA Sequencer durchgeführt.

Inhalt

Animaltype **Pig** PCR Amplification Kit (100 Reaktionen)

| | |
|--|--------|
| Nuklease-freies Wasser (Nuclease-free Water) | 3.0 mL |
| Reaktionsgemisch D (Reaction Mix D) | 500 µL |
| Primergemisch (Primer Mix) | 250 µL |
| Kontroll-DNA DL157 (Control DNA DL157) | 10 µL |
| DNA Längenstandard 550 (DNA Size Standard 550) | 25 µL |
| Allelleiter (Allelic Ladder) | 10 µL |

Bestellinformation

| | | | | |
|-----------------------|------|------------|---------------|---------------|
| Animaltype Pig | 25 | Reaktionen | Artikelnummer | 11-12110-0025 |
| Animaltype Pig | 100 | Reaktionen | Artikelnummer | 11-12110-0100 |
| Animaltype Pig | 400 | Reaktionen | Artikelnummer | 11-12110-0400 |
| Animaltype Pig | 1000 | Reaktionen | Artikelnummer | 11-12110-1000 |

Lagerung

Die Lagerung über einen längeren Zeitraum empfehlen wir bei -20°C . Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Das Primergemisch und die Allelleiter sollten lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die DNA Proben und post-PCR Reagenzien (Allelleiter und DNA Längenstandard) sollten getrennt von den PCR Reagenzien gelagert werden. Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

Qualitätssicherung

Der gesamte Inhalt des Biotype[®] Testkits wird einer intensiven Qualitätssicherung durch die Biotype Diagnostic GmbH unterzogen. Die Qualität der Testkits wird kontinuierlich überprüft, um die uneingeschränkte Verwendbarkeit zu belegen. Bitte kontaktieren Sie uns in allen Fragen zur Qualitätssicherung.

Zusätzliche Reagenzien

Für die Amplifikation und Probenvorbereitung benötigen Sie neben den im Biotype[®] Testkit enthaltenen Bestandteilen folgende Reagenzien:

| Reagenz | Lieferant | Bestellnummer |
|---|--------------------|-------------------------|
| JumpStart [™] Taq DNA Polymerase hot start, 2,5 U/μL, 50 U oder 250 U | Sigma-Aldrich | D4184 |
| Hi-Di [™] Formamide, 25 mL | Applied Biosystems | 4311320 |
| Matrix Standards (DS-30) für ABI PRISM [®] 310 Genetic Analyzer und ABI PRISM [®] 377 DNA Sequencer | Applied Biosystems | 401546 und 402996 (NED) |
| Matrix Standards (DS-30) für ABI PRISM [®] 3100/3130 und ABI PRISM [®] 3700/3730 | Applied Biosystems | 4345827 |
| Qiagen DNeasy [®] Blood & Tissue Kit, 50 Preparations | Qiagen | 69504 |

Warenzeichen und Patente

ABI PRISM[®], GeneScan[®], Genotyper[®] GeneMapper[™] ID und Applied Biosystems sind eingetragene Warenzeichen der Applied Biosystems Inc.

6-FAM, HEX, NED, ROX, POP-4 und Hi-Di sind Warenzeichen der Applied Biosystems Inc.

GeneAmp[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen von Roche Molecular Systems.

Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Patentinhaber sind die Firmen Roche Molecular Systems und F. Hoffmann-La Roche (Roche).

DyeEx[™] und DNeasy[®] sind eingetragene Warenzeichen von Qiagen.

Warnungen und Sicherheitshinweise

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem Testkit enthalten:

| Kitbestandteil | Chemikalie | Gefahr |
|--|------------------------------|--|
| Primergemisch, Reaktionsgemisch und Allelleiter | Natriumazid NaN ₃ | giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase |

Bitte beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt.

Für Biotype[®] Kitkomponenten sind die Sicherheitsdatenblätter bei uns erhältlich. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. PCR Amplifikation..... | 7 |
| 1.1 Ansatz des Master Mixes..... | 7 |
| 1.2 PCR Amplifikationsparameter..... | 8 |
| 2. Elektrophorese am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer | 9 |
| 2.1 Zusammensetzung des 5%igen Polyacrylamid-Gels | 9 |
| 2.2 Probenvorbereitung..... | 9 |
| 2.3 Einstellungen der GeneScan® Software | 10 |
| 3. Elektrophorese am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer | 11 |
| 3.1 Matrixerstellung | 11 |
| 3.2 Probenvorbereitung..... | 14 |
| 3.3 Einstellungen der GeneScan® Software | 14 |
| 3.4 Analyse Parameter | 15 |
| 4. Elektrophorese am ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer..... | 16 |
| 4.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung..... | 16 |
| 4.2 Probenvorbereitung..... | 19 |
| 4.3 Einstellung der GeneMapper™ ID Software | 19 |
| 4.4 Analyse Parameter (Analysis Method) | 21 |
| 5. Auswertung | 22 |
| 5.1 Kontrollen..... | 24 |
| 5.2 Fragmentlängen und Allele | 24 |
| 6. Interpretation der Ergebnisse | 30 |

Protokolle für die Amplifikation, Elektrophorese und Auswertung

1. PCR Amplifikation

1.1 Ansatz des Master Mixes

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der eingesetzten PCR Reagenzien bei 3 µL DNA Probenvolumen (Template DNA) in einem Reaktionsvolumen von 25 µL. Berücksichtigen Sie bei der Anzahl der PCR-Reaktionen die Positiv- und Negativkontrolle. Fügen Sie zu dieser Zahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

| Volumen in [µL] | Anzahl der PCR-Reaktionen | | | |
|--|---------------------------|-------|-------|--------|
| | 1 | 10 | 25 | 100 |
| Nuklease-freies Wasser | 14.1 | 141.0 | 352.5 | 1410.0 |
| Reaktionsgemisch D* | 5.0 | 50.0 | 125.0 | 500.0 |
| Primergemisch | 2.5 | 25.0 | 62.5 | 250.0 |
| Taq DNA Polymerase (hot start, 2.5 U/µL) | 0.4 | 4.0 | 10.0 | 40.0 |
| Volumen des Master Mix | 22.0 | 220.0 | 550.0 | 2200.0 |

* enthält Mg²⁺, dNTP Mix, BSA

Alle Reagenzien sollten vor dem Ansetzen des Master Mixes gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert werden (ca. 10 sec).

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration. In der Regel ist 1 µL ausreichend. Eine Erhöhung der DNA-Menge über 5 µL hinaus ist nicht empfehlenswert, da enthaltene PCR-Inhibitoren u.U. nicht hinreichend ausverdünnt werden. Die Menge an Nuklease-freiem Wasser ist entsprechend zu korrigieren, sodass das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes immer 25 µL beträgt.

Lagern Sie Ihre DNA Proben in Nuklease-freiem Wasser oder in verdünntem TE Puffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0 und 1 mM EDTA), z. B. 0.1x TE Puffer.

Die Primergemische sind so eingestellt, dass mit **1-10 ng Kontroll-DNA DL157** in einem Reaktionsvolumen von 25 µL bei **30 PCR-Zyklen** ausgewogene Peakhöhen erreicht werden. Wird mehr Template DNA eingesetzt, so sind bei kleinen PCR-Fragmenten sehr hohe Peaks und bei größeren PCR-Fragmenten verhältnismäßig niedrige Peaks zu erwarten. Reduzieren Sie die DNA-Menge, um diese Unausgewogenheit zu korrigieren.

Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle verdünnen Sie die Kontroll-DNA DL157 auf 1-10 ng in dem entsprechenden Volumen. Pipettieren Sie die verdünnte Kontroll-DNA anstelle der Template DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Master Mix.

Negativkontrolle

Als Negativkontrolle pipettieren Sie Nuklease-freies Wasser an Stelle der Template DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Master Mix.

1.2 PCR Amplifikationsparameter

Um die Taq DNA Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „hot start“ durchgeführt werden.

Standard Methode

empfohlen für alle DNA Proben

| Temperatur | Zeit | |
|------------|--------------|---|
| 94°C | 4 min | (hot start für Aktivierung der JumpStart™ Taq DNA Polymerase) |
| 94°C | 20 s | |
| 60°C | 40 s | 30 Zyklen |
| 72°C | 30 s | |
| 70°C | 60 min | |
| 10°C | ∞ | bis zum Ende |

2. Elektrophorese am ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, der Matrixerstellung und der Anwendung der GeneScan® Analysis Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® 377 DNA Sequencer User's Manual* entnommen werden. Im Folgenden wird die Elektrophorese mit der GeneScan® Software beschrieben.

Für den kombinierten Einsatz der vier Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, HEX, NED** und **ROX** (auch **DS-30** genannt) ist die Nutzung des virtuellen **Filter Sets D** vorgesehen. Grundsätzlich jedoch sind die Filter Sets A und F ebenfalls geeignet. Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse mit dem Filter Set D muss zunächst eine Matrix mit den entsprechenden vier Fluoreszenzfarbstoffen für das jeweilige Analysegerät erstellt werden. Den geeigneten Matrix Standard erhalten Sie von Applied Biosystems.

2.1 Zusammensetzung des 5%igen Polyacrylamid-Gels

| Komponente | Menge/Volumen |
|--|---------------|
| Harnstoff | 21.0 g |
| 30%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) | 8.4 mL |
| 10× TBE-Puffer | 6.0 mL |
| Wasser | 20.0 mL |
| <hr/> | |
| Flüssigkeit filtrieren und entgasen | |
| 10%iges Ammoniumpersulfat | 350 µL |
| TEMED | 15 µL |
| <hr/> | |
| Glasplatten mit 36 cm Trennstrecke verwenden | |

2.2 Probenvorbereitung

| Komponente | Volumen |
|---|---------|
| Hi-Di™ Formamide / Blue Dextran | 1.8 µL |
| DNA Längenstandard 550 (ROX) | 0.2 µL |
| PCR-Produkt (ggf. verdünnt) bzw. Alleleiter | 1.0 µL |
| <hr/> | |
| - 3 min denaturieren bei 95°C | |
| - 3 min kühlen bei 4°C | |
| - 1.5 µL Probe auf das Gel auftragen | |

2.3 Einstellungen der GeneScan® Software

Plate Check Module **D**

PreRun Module "GS PR 36D - 1200"

Run Module "GS Run 36D - 1200"

Matrix **D** (6-FAM, HEX, NED, ROX)

Standard SST550 (ROX)

Programmierung des Run Moduls für Biotype® Testkits (6-FAM / HEX / NED / ROX)

- Programm "377 Collection" öffnen
- File - New - GeneScan Run öffnen
- Im Run-Fenster das Modul "GS Run 36D -1200" auswählen
- Neben dem Run-Fenster befindliches Blatt-Symbol anklicken
- Folgende Einstellungen vornehmen:

| Parameter | Einstellung | |
|------------------|--------------------|--|
| Voltage | 3000 V | |
| Current | 50.0 mA | |
| Power | 150 W | |
| Collection time | 3.0 h | Speichern des Moduls im Feld „Save Copy“ |
| Gel temperature | 51°C | |
| Laser power | 40.0 mW | |

3. Elektrophorese am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, der Matrixerstellung und der Anwendung der GeneScan® bzw. GeneMapper™ ID Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual* entnommen werden. Im Folgenden wird die Elektrophorese mit der GeneScan® Software beschrieben.

Für den kombinierten Einsatz der vier Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, HEX, NED** und **ROX** (auch **DS-30** genannt) ist von Applied Biosystems die Nutzung des virtuellen **Filter Sets D** vorgesehen. Grundsätzlich jedoch sind die Filter Sets A und F ebenfalls geeignet.

Material

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| Kapillare | 47 cm / 50 µm (grün) |
| Polymer | 310 Genetic Analyzer POP-4 |
| Puffer | 10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA |

3.1 Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse mit dem Filter Set D muss zunächst eine Matrix mit PCR-Fragmenten der entsprechenden vier Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, HEX, NED und ROX für das jeweilige Analysegerät erstellt werden. Den geeigneten Matrix Standard erhalten Sie von Applied Biosystems.

| Fluoreszenzfarbe | Matrix Standard | Bestellnummer |
|------------------|-----------------|----------------------------|
| Blau (B) | 6-FAM | Applied Biosystems, 401546 |
| Grün (G) | HEX | Applied Biosystems, 401546 |
| Gelb (Y) | NED | Applied Biosystems, 402996 |
| Rot (R) | ROX | Applied Biosystems, 401546 |

Zur Erstellung von geeigneten Matrix Files werden vier Elektrophoresen unter den gleichen Bedingungen ausgeführt, wie sie auch für Proben und Allelleitern des Biotype® Testkits gelten. Für die vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, HEX, NED und ROX muss jeweils ein eigener Elektrophoreselauf durchgeführt werden.

| Matrix Probe | Komponente | Volumen |
|----------------|------------------------------|---------|
| Matrix Probe 1 | Hi-Di™ Formamide | 12.5 µL |
| | Matrix Standard 6-FAM | 1.0 µL |
| Matrix Probe 2 | Hi-Di™ Formamide | 12.5 µL |
| | Matrix Standard HEX | 1.0 µL |
| Matrix Probe 3 | Hi-Di™ Formamide | 12.5 µL |
| | Matrix Standard NED | 1.0 µL |
| Matrix Probe 4 | Hi-Di™ Formamide | 12.5 µL |
| | Matrix Standard ROX | 1.0 µL |

- 3 min denaturieren bei 95°C
- 3 min kühlen bei 4°C
- gesamten Probenansatz zur Analyse auf Tray laden

- Probenliste **Sample Sheet** erstellen und Proben bezeichnen

Injektionsliste für die Matrixerstellung

Injection list

| | |
|----------------|-----------------------|
| Module File | GS STR POP-4 (1 mL) D |
| Matrix File | NONE |
| Size Standard* | NONE |
| Injection [s] | 5 |
| Injection [kV] | 15.0 |
| Run [kV] | 15.0 |
| Run [°C] | 60 |
| Run Time [min] | 24 |

* Matrix Standards sind immer **ohne DNA Längenstandard (ROX)** vorzubereiten

Analyse der Matrix Proben

- Starten der GeneScan® bzw. GeneMapper™ ID Software
- FILE → NEW → PROJECT (Ordner des entsprechenden Laufs öffnen)
→ ADD SAMPLE FILES
- Markieren der Matrix Probe in der Spalte SAMPLE FILE
- SAMPLE → RAW DATA
- Bewerten, ob eine stabile Basislinie vorhanden ist. Es sollten mindestens fünf Peaks mit 400-4000 Peakhöhen (Y) in jeder Matrix Probe erkennbar sein (optimaler Bereich: 1000-3000), siehe Abb. 2

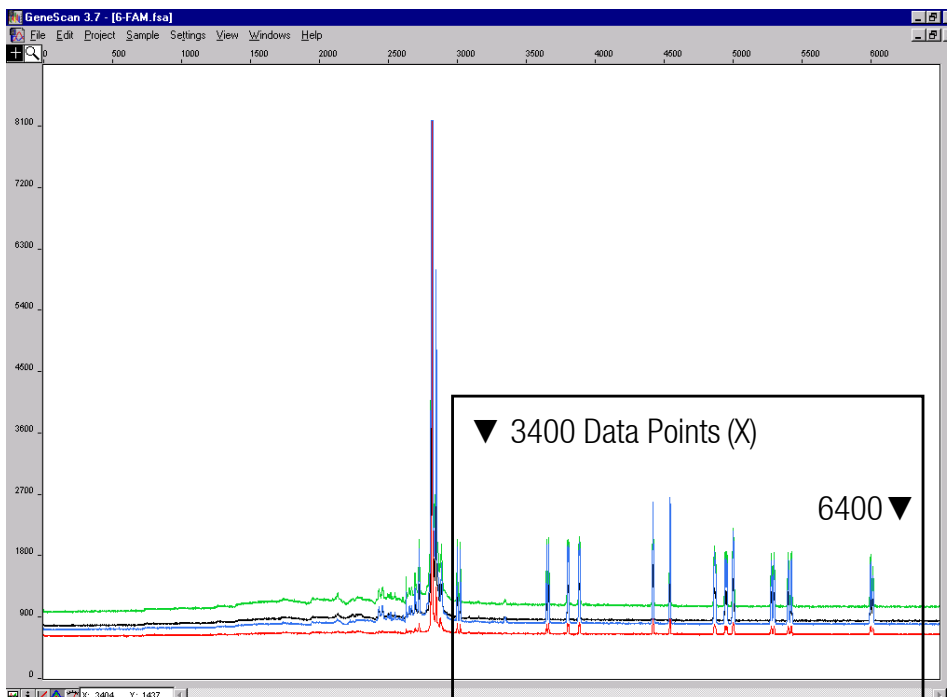


Abb. 2 Elektropherogramm der Rohdaten des Matrix Standards 6-FAM

- Auswahl des Analysebereichs mit stabiler, ebener Basislinie
- Falls notwendig, injizieren Sie die Matrix Probe noch einmal
- Notieren von Anfangs- und Endpunkten (Data Points) des Auswahlbereiches, z. B. Anfangswert 3400, Endwert 6400
- Differenzwert berechnen, z. B. $6400 - 3400 = 3000$ Data Points

Neue Matrix erstellen

- FILE → NEW → MATRIX, siehe Abb. 3

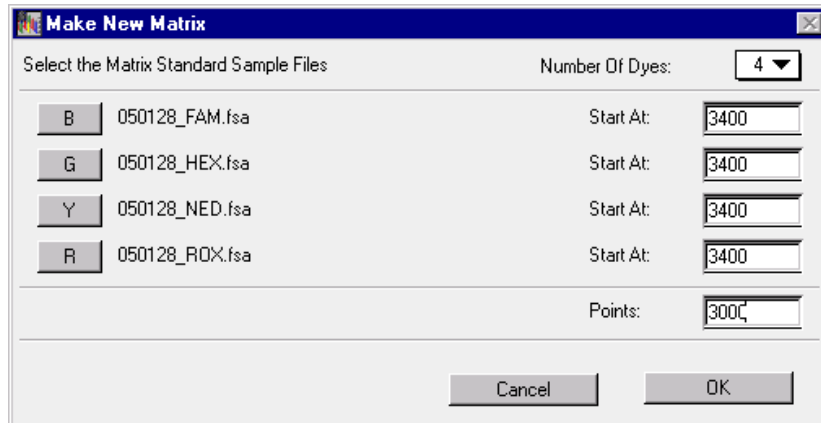


Abb. 3 Matrix Proben auswählen

- Matrix Proben für jede Farbe (B, G, Y, R) importieren
- Jeweiligen Anfangspunkt bei *Start At* eintragen, z. B. 3400
- Errechneten Differenzwert z. B. 3000 bei *Points* eintragen
- Nach der Bestätigung mit OK wird die neue Matrix berechnet, siehe Abb. 4

| Reactions | | | | |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| | B | G | Y | R |
| B | 1.0000 | 0.4164 | 0.0415 | 0.0012 |
| G | 0.8472 | 1.0000 | 0.6883 | 0.0107 |
| Y | 0.4509 | 0.4886 | 1.0000 | 0.0456 |
| R | 0.1273 | 0.1792 | 0.4964 | 1.0000 |

Abb. 4 neue Matrix Biotype

- Speichern im Matrix Ordner: FILE → SAVE AS, z. B. Matrix Biotype

Matrix prüfen

Bitte überprüfen Sie die neue Matrix mit Ihren aktuellen Proben.

- FILE → NEW → PROJECT (Ordner des entsprechenden Laufs öffnen),
→ ADD SAMPLE FILES
- Markieren Sie die aktuelle Probe in der Spalte SAMPLE FILE
- SAMPLE → INSTALL NEW MATRIX
(Matrix Ordner öffnen und neue Matrix auswählen)
- Proben neu analysieren

Mit der neuen Matrix sollte es **keine** Überstrahlungen (Pull-up Peaks) zwischen den verschiedenen Farbpanels (B, G, Y, R) mehr geben.

3.2 Probenvorbereitung

| Komponente | Volumen |
|------------------------------|---------|
| Hi-Di™ Formamide | 12.3 µL |
| DNA Längenstandard 550 (ROX) | 0.2 µL |

12 µL Gemisch (Formamid+ Längenstandard) für alle Proben vorlegen
 1 µL PCR-Produkt (ggf. verdünnt) bzw. Alleleiter zugeben

- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C
- gesamten Probenansatz zur Analyse auf Tray laden

Signalintensitäten

Möglichkeiten zur Erhöhung der Signalintensitäten:

- Reduzierung der Anteile am DNA Längenstandard 550 (ROX) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte mit DyeEx™ 2.0 Spin Kit, Qiagen (63204)

3.3 Einstellungen der GeneScan® Software

- Probenliste **Sample Sheet** erstellen und Proben bezeichnen

Injektionsliste

Injection list

| | |
|------------------|------------------------------|
| Module File | GS STR POP-4 (1 mL) D |
| Matrix File | z. B. Matrix Biotype |
| Size Standard | z. B. SST550_50-500bp |
| Injection [s]* | 5 |
| Injection [kV] | 15.0 |
| Run [kV] | 15.0 |
| Run [°C] | 60 |
| Run Time [min]** | 28 |

* Abweichend von der Standardeinstellung kann die Injektionszeit je nach Probe zwischen 1 und 10 s betragen. Handelt es sich um Vergleichsproben mit sehr hohen Peakhöhen, so kann zur Vermeidung von Überstrahlungen eine kürzere Injektionszeit gewählt werden. Bei Spurenproben können bis zu 10 s notwendig sein.

** Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Animaltype **Pig** verändert worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **500 bp** analysiert werden können.

3.4 Analyse Parameter

Die empfohlenen Analyse Parameter sind:

| | |
|-----------------------|--|
| Analysis Range | Start: 2000 Stop: 10000 |
| Data Processing | Baseline: Checked Multicomponent: Checked Smooth Options: Light |
| Peak Detection | Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 pts** |
| Size Call Range | Min: 50 Max: 550 |
| Size Calling Method | Local Southern Method |
| Split Peak Correction | None |

* Der Grenzwert der Peakamplituden (threshold) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneScan® bzw. GeneMapper™ ID Software als einen Peak erkennt. Übliche Werte sind 50-200 RFU und sollten individuell vom Analyselabor festgelegt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte mindestens 3x so hoch sein wie das umgebende Grundrauschen der Basislinie.

** Gelegentlich können Punktallele, d. h. Allele mit einem Abstand von mindestens 1 bp zum nächsten ganzzahligen Allel, wie die 387A12F Allele 13 und 13.1 oder 16 und 16.1 nicht unterschieden werden. Falls notwendig kann die Peak Window Size noch weiter verringert werden.

4. Elektrophorese am ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, zur Spektralkalibrierung und der Anwendung der ABI PRISM® Data Collection Software und der GeneMapper™ ID Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide* entnommen werden. Im Folgenden wird die Elektrophorese mit der GeneMapper™ ID Software beschrieben.

Das 4-Kapillarsystem trägt die Bezeichnung ABI 3130 (zuvor ABI 3100-Avant), das 16-Kapillarsystem ABI 3130xl (zuvor ABI 3100).

Für den kombinierten Einsatz der vier Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, HEX, NED** und **ROX** (auch **DS-30** genannt) ist die Verwendung des **Dye Set D** vorgesehen.

Material

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| Kapillare | 3130 Capillary Array, 36 cm |
| Polymer | 3130 POP-4 Polymer |
| Puffer | 10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA |

4.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse muss zunächst eine Spektralkalibrierung mit PCR-Fragmenten der entsprechenden vier Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, HEX, NED und ROX für das jeweilige Analysegerät durchgeführt werden. Auf diese Weise wird eine Matrix erstellt, die das Überlappen der farbspezifischen Fluoreszenzemissionsspektren korrigiert.

Die Spektralkalibrierung gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

- Auswahl und Vorbereitung der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung
- Laden der Standards in die 96-Lochplatte (je Kapillare eine Probe)
- Erstellung des Instrument Protokolls zur Durchführung der Spektralkalibrierung (Protocol Manager)
- Plattenzusammensetzung im Plattenditor festlegen (Plate Manager)
- Durchführung des Laufs zur Spektralkalibrierung und Bewertung der Daten

Vorbereitung der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung

Beispiel für 4 Kapillaren/ABI 3130

| Komponenten | Volumen |
|------------------|---------|
| Hi-Di™ Formamide | 47.5 µL |
| Matrix Standard | 2.5 µL |

- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C
- 10 µL des Standards in 96-Lochplatte laden, Position **A1-D1**

Beispiel für 16 Kapillaren/ABI 3130xl

| Komponenten | Volumen |
|------------------|---------|
| Hi-Di™ Formamide | 190 µL |
| Matrix Standard | 10.0 µL |

- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C
- 10 µL des Standards in 96-Lochplatte laden, Position **A1-H1** und **A2-H2**

Analyse der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung

- Vorbereiten der 96-Lochplatte und in den Autosampler setzen
- Im **Protocol Manager** der Data Collection Software im Fenster **Instrument Protocol** auf **New** klicken, um den **Protocol Editor** zu öffnen

Instrument Protocol zur Spektralkalibrierung

Protocol Editor

| | |
|--------------|----------------------------|
| Name | z. B. Spectral36_POP4_DS30 |
| Type | SPECTRAL |
| Dye Set | D |
| Polymer | POP4 |
| Array Length | 36 |
| Chemistry | Matrix Standard |
| Run Module | Spect36_POP4_1 |

- **OK** wählen, um den **Protocol Editor** zu verlassen

- Im **Plate Manager** der Data Collection Software auf **New** klicken, um **Plate Dialog** zu öffnen

Platteneditor zur Spektralkalibrierung (I)

New Plate Dialog

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| Name | z. B. Spectral_DyeSet D_Datum |
| Application | Spectral Calibration |
| Plate Type | 96-Well |
| Owner Name / Operator Name | ... |

- **OK** wählen. Auf diese Weise öffnet sich automatisch eine neue Tabelle im Platteneditor
- Für weitere Analysen zur Spektralkalibrierung auf **Import** klicken, die entsprechende .xml Datei auswählen und öffnen

Platteneditor zur Spektralkalibrierung (II)

Spalte

| | |
|-----------------------|--|
| Sample Name | Benennung der Matrixproben |
| Priority | z. B. 100 |
| Instrument Protocol 1 | Spectral36_POP4_DS30 (Einstellung zuvor beschrieben) |

- In die obersten Zellen der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen, über **Edit** → **Fill Down** diese Informationen den ausgewählten Matrixproben zufügen und mit **OK** bestätigen
- In **Run Schedule** → **Find All** anklicken, dann **link** wählen, um die 96-Lochplatte auf dem Autosampler mit der soeben erstellten Plattenbezeichnung zu verknüpfen (Position A oder B). Anschließend den Lauf starten
- Der Ablauf und mögliche Fehler der Spektralkalibrierung für jede einzelne Kapillare können in **Event Log** und **Spectral Viewer** nachverfolgt werden

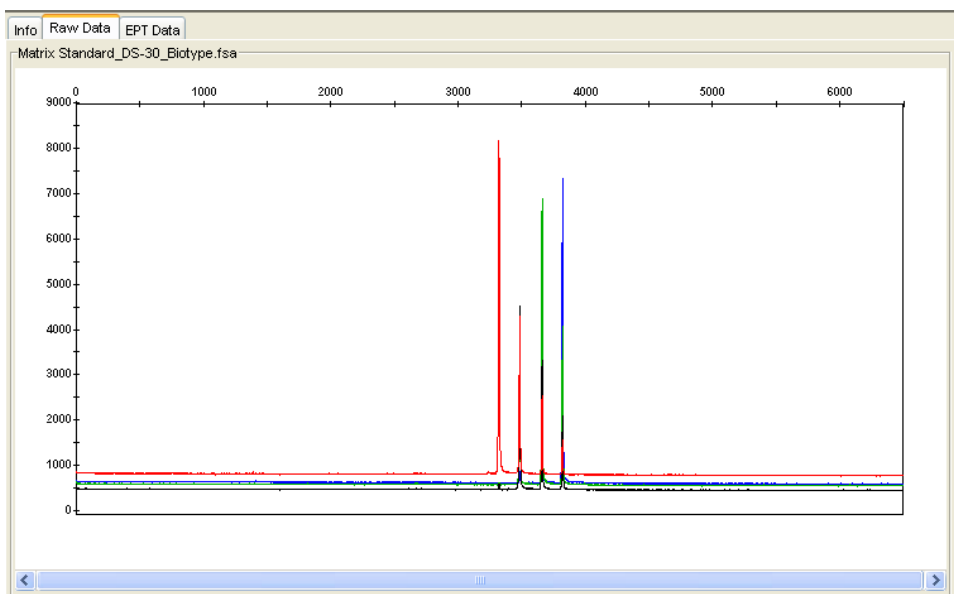


Abb. 5 Elektropherogramm der Rohdaten des Matrix Standards DS-30

Hinweis: Haben alle Kapillaren die Kalibrierung erfolgreich durchlaufen, aktivieren Sie im **Spectral Viewer** die Kalibrierungsdatei für das Dye Set D.

4.2 Probenvorbereitung

| Komponenten | Volumen |
|---|---------|
| Hi-Di™ Formamide | 12.3 µL |
| DNA Längenstandard 550 (ROX) | 0.2 µL |
| 12 µL Gemisch (Formamid+ Längenstandard) für alle Proben vorlegen | |
| 1 µL PCR-Produkt (ggf. verdünnt) oder Allelleiter zugeben | |
| - 3 min denaturieren bei 95°C | |
| - abkühlen auf 4°C | |
| - gesamten Probenansatz zur Analyse auf Tray laden | |

Da die Injektion gleichzeitig für alle Kapillaren stattfindet, müssen am 4-Kapillargerät immer 4 Proben auf der Platte pipettiert werden. Falls weniger Proben zu messen sind, müssen die entsprechenden Positionen mit 12 µL Hi-Di™ Formamide aufgefüllt werden.

Um eine sichere Allelzuordnung am 4-Kapillargerät zu gewährleisten, sollte unabhängig von der Probenanzahl auf jeder Kapillare eine Allelleiter 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.

4.3 Einstellung der GeneMapper™ ID Software

- Vorbereiten der 96-Lochplatte und in den Autosampler setzen
- Im **Protocol Manager** der Data Collection Software im Fenster **Instrument Protocol** auf **New** klicken, um den **Protocol Editor** zu öffnen

Instrument Protocol

Protocol Editor

| | |
|-------------|------------------------------|
| Name | Run36_POP4_DyeSet D |
| Type | REGULAR |
| Run Module* | HIDFragmentAnalysis36_POP4_1 |
| Dye Set | D |

* auf der Folgeseite ist die **Einstellung des Run Moduls** exakt beschrieben

- **OK** wählen, um den Protokollreditor zu verlassen

Vor dem ersten Probenlauf muss das Run Modul wie folgt editiert werden:

- Im **Module Manager** der Data Collection Software auf **New** klicken, um den **Run Module Editor** zu öffnen

Run Modul 24min_50-500bp

Run Modul Editor

| | |
|-------------------------|-------------|
| Oven Temperature [°C] | 60 |
| Poly Fill Volume | 4840 |
| Current Stability [µA] | 5 |
| PreRun Voltage [kV] | 15 |
| PreRun Time [s] | 180 |
| Injection Voltage [kV] | 3.0 |
| Injection Time [s]* | 5 |
| Voltage Number of Steps | 40 |
| Voltage Step Interval | 15 |
| Data Delay Time [s] | 1 |
| Run Voltage [kV] | 15.0 |
| Run Time [s]** | 1440 |

* Abweichend von der Standardeinstellung kann die Injektionszeit je nach Probe zwischen 1 und 10 s betragen. Handelt es sich um Vergleichsproben mit sehr hohen Peakhöhen, kann zur Vermeidung von Überstrahlungen eine kürzere Injektionszeit gewählt werden. Bei Spurenproben können bis zu 20 s notwendig sein.

** Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Animaltype **Pig** verändert worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **500 bp** analysiert werden können.

- Auf **Save As** klicken, den Namen des neuen Moduls eingeben (z. B. 24min_50-500bp) und mit **OK** bestätigen
- Zum Verlassen des Module Editors auf **Close** klicken

Vor jedem Probenlauf muss die zu messende Platte wie folgt angelegt werden:

- Im **Plate Manager** der Data Collection Software auf **New** klicken, um **New Plate Dialog** zu öffnen

GeneMapper™ Plattenditor (I)

New Plate Dialog

| | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| Name | z. B. Plate_DyeSet D_Datum |
| Application | wählen Sie GeneMapper Application |
| Plate Type | 96-Well |
| Owner Name / Operator Name | ... |

- **OK** wählen. Auf diese Weise öffnet sich automatisch eine neue Tabelle im Plattenditor

GeneMapper™ Plattenditor

Spalte

| | |
|-----------------------|---|
| Sample Name | Benennung der Probe |
| Priority | z. B. 100 (Voreinstellung) |
| Sample Type | Probe oder Allelleiter |
| Size Standard | z. B. SST550_50-500bp |
| Panel | z. B. Animaltype_Panels_v1 (Testkit auswählen) |
| Analysis Method | z. B. Analysis_HID_3130 |
| Snp Set | - |
| User-defined 1-3 | - |
| Results Group 1 | (Results Group auswählen) |
| Instrument Protocol 1 | Run36_POP4_DyeSet D (Einstellung zuvor beschreiben) |

- In die obersten Zellen der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen, über **Edit** → **Fill Down** diese Informationen den ausgewählten Proben zuzufügen und mit **OK** bestätigen
- In **Run Schedule** → **Find All** anklicken, dann auf **link** klicken, um die 96-Lochplatte auf dem Autosampler mit der soeben erstellten Plattenbezeichnung zu verknüpfen (Position A oder B). Anschließend den Lauf starten
- Die Qualität der Rohdaten kann während des Laufs für jede einzelne Kapillare im **Capillaries Viewer** oder **Cap/Array Viewer** beobachtet werden. Mögliche Fehlermeldungen (**Error Status**) erscheinen in **Event Log**
- Die Daten des Probenlaufs werden unter **Run History** oder **Cap/Array Viewer** der Data Collection Software im Überblick dargestellt. Die Laufdaten der Proben werden im **Run Folder** der zuvor gewählten **Results Group** abgelegt

4.4 Analyse Parameter (Analysis Method)

Die empfohlenen Einstellungen im Tabellenblatt Peak Detector sind:

| | |
|---------------------------|---|
| Peak Detection Algorithm | Advanced |
| Ranges | Analysis: Partial Range Start Pt: 2000; Stop Pt: 10000 Sizing: All Sizes |
| Smoothing and Baselineing | Smoothing: Light Baseline Window: 51 pts |
| Size Calling Method | Local Southern Method |
| Peak Detection | Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 pts** Slope Thresholds: 0.0 |

* Der Grenzwert der Peakamplituden (threshold) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneMapper™ ID Software als einen Peak erkennt. Übliche Werte sind 50-200 RFU und sollten individuell vom Analyzelabor festgelegt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte mindestens 3x so hoch sein wie das umgebende Grundrauschen der Basislinie.

** Gelegentlich können Punktallele, d. h. Allele mit einem Abstand von mindestens 1 bp zum nächsten ganzzahligen Allel, wie die 387A12F Allele 13 und 13.1 oder 16 und 16.1 nicht unterschieden werden. Falls notwendig kann die Peak Window Size noch weiter verringert werden.

5. Auswertung

Allgemeine Anweisungen zur automatischen Auswertung können der entsprechenden Anleitung *GeneScan*[®] oder *GeneMapper*[™] *ID Software User's Manual* entnommen werden.

Die Ermittlung der genauen Fragmentlängen der amplifizierten Produkte ist abhängig vom Gerätetyp, von den Elektrophoresebedingungen sowie von dem verwendeten DNA Längenstandard. Aufgrund der Komplexität einiger STR-Loci sollten möglichst viele, gleichmäßig verteilte Referenzpunkte zur Längenbestimmung herangezogen werden. Hierzu verwenden Sie den DNA Längenstandard 550 (ROX) mit den Fragmentlängen **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.**

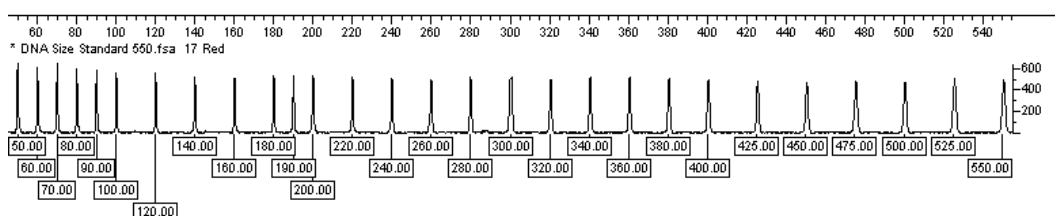


Abb. 6 Elektropherogramm des DNA Längenstandard 550 (ROX), Fragmentlängen in bp

Die Allelzuordnungen der aufgetrennten PCR-Produkte (Genotyping) kann mit Hilfe geeigneter Auswertungssoftware erfolgen, z. B. mit *GeneMapper*[™] *ID* oder *Genotyper*[®] Software in Kombination mit **Animaltype Pig** Auswertevorlagen der Biotype Diagnostic GmbH. *Mentype*[®] Auswertevorlagen (Template Files) für *GeneMapper*[™] *ID* oder *Genotyper*[®] Software finden Sie auf unserer Homepage (www.biotype.de) zum Download. Auf Anfrage senden wir Ihnen gerne eine CD-ROM zu.

Besonderheiten

SBH4

In seltenen Fällen wurden aufgrund von Basenaustauschen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) innerhalb der Wiederholungseinheiten Abweichungen zwischen der Allelleiter und den DNA Probensignalen von ca. 0,6 bp beobachtet. Eine exakte Zuordnung aller Allele gegenüber der Allelleiter gelingt jedoch durch die Einstellung eines Toleranzbereiches von $\pm 1,0$ bp in der Auswertesoftware. In den Biotype[®] Template Files für Genotyper[®] und GeneMapper[™] wurde diese Einstellung bereits vorgenommen.

SBH1

Aufgrund von SNPs außerhalb der Wiederholungseinheiten kommt es bei den Allelen 14 und 15 zu abweichenden Fragmentlängen. Eine exakte Zuordnung dieser Allele gegenüber der Allelleiter gelingt durch die Einstellung eines Toleranzbereiches von $\pm 2,0$ bp in der Auswertesoftware. In den Biotype[®] Template Files für Genotyper[®] und GeneMapper[™] wurde diese Einstellung bereits vorgenommen.

SBH23 (Amelogenin)

Aufgrund eines Baseneinschubs kommt es beim X-spezifischen Fragment zu einer abweichenden Fragmentlängen von $+ 1,0$ bp. Eine exakte Zuordnung des X-spezifischen Allels gegenüber der Allelleiter gelingt durch die Einstellung eines Toleranzbereiches von $\pm 2,0$ bp in der Auswertesoftware. In den Biotype[®] Template Files für Genotyper[®] und GeneMapper[™] wurde diese Einstellung bereits vorgenommen.

Unspezifische Amplifikate

Bei ca. 6% der DNA Proben der Biotype Diagnostic GmbH wurden zwei zusätzliche Peaks beobachtet, die bei ca. 294 bp zwischen den Allelbereichen von SBH18 und SBH4 im 6-FAM sowie bei 298 bp im Allelbereich von SBH1 im HEX liegen. Diese Artefakte sind jedoch nicht deckungsgleich mit Signalen der Allelleiter bzw. wurden bisher nicht in Populationsstudien als Allele beobachtet.

Im bestehenden Assay wurden teilweise Dropouts in den Markern SBH18 (Allel 18, 19, 20, 21, 22, 23) und S0655 (Allel 14, 15, 16, 17, 18, 22) beobachtet.

5.1 Kontrollen

Die im Testkit enthaltene Kontroll-DNA DL157 repräsentiert die folgenden Allele:

Tabelle 4. Allelzuordnungen mit Animaltype Pig

| Locus | Kontroll-DNA DL157 |
|--------------|---------------------------|
| 387A12F | 13/21 |
| S0655 | 9/12 |
| SBH1 | 14/16 |
| SBH2 | 22/33 |
| SBH4 | 56/62 |
| SBH10 | 48/49 |
| SBH13 | 13/15 |
| SBH18 | 12/14 |
| SBH19 | 14/14 |
| SBH20 | 32/39 |
| SBH22 | 20/23 |
| SBH23 | Y/X |

5.2 Fragmentlängen und Allele

Die in **Tabelle 5** bis **Tabelle 7** angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA Längenstandard 550 (ROX) und die Messung am ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer mit POP-4 Polymer. Unterschiedliche Analysegeräte, DNA Längenstandards oder Polymere können zu anderen Fragmentlängen führen. Die Tabellen enthalten Richtwerte für die Erstellung einer entsprechenden Auswertungsvorlage. Eine weitere Feinabstimmung unter Zuhilfenahme tatsächlicher (am eigenen Gerät) gemessener Fragmentlängen sollte aufgrund gerätespezifischer Abweichungen vorgenommen werden. Es wird empfohlen, stets zusätzlich einen visuellen Abgleich mit der entsprechenden Allelleiter vorzunehmen.

Skalierung

Horizontal: 75-505 bp

Vertikal: nach Signalintensität der Proben

Abbildung 7

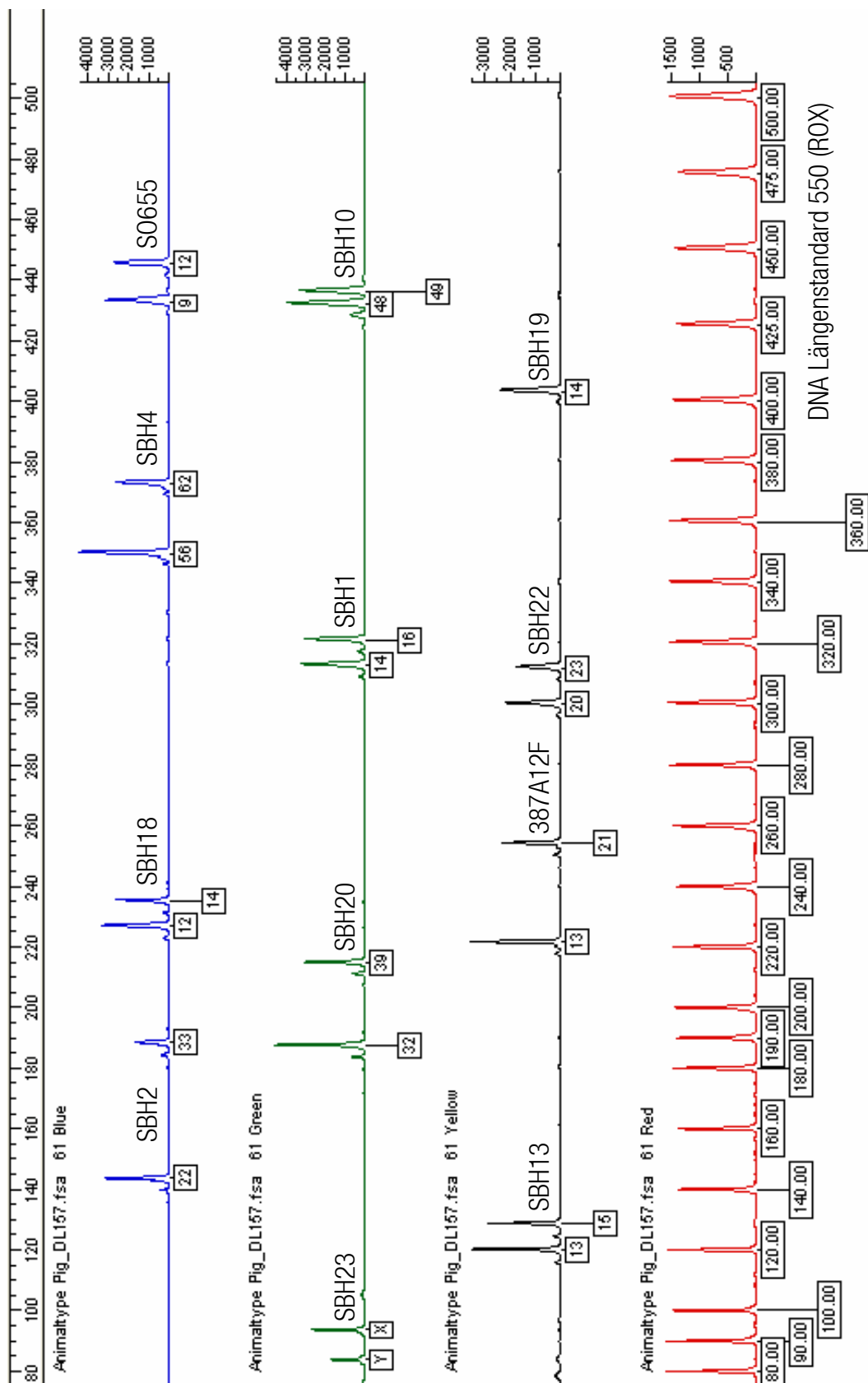


Abb. 7 Elektropherogramm des Animaltype **Pig** unter Verwendung von 2 ng Kontroll-DNA DL157. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer mit dem DNA Längenstandard 550 (ROX). Die Allelzuordnung wurde mit Hilfe der Genotyper® Software und dem Animaltype **Pig** Template File durchgeführt.

Abbildung 8

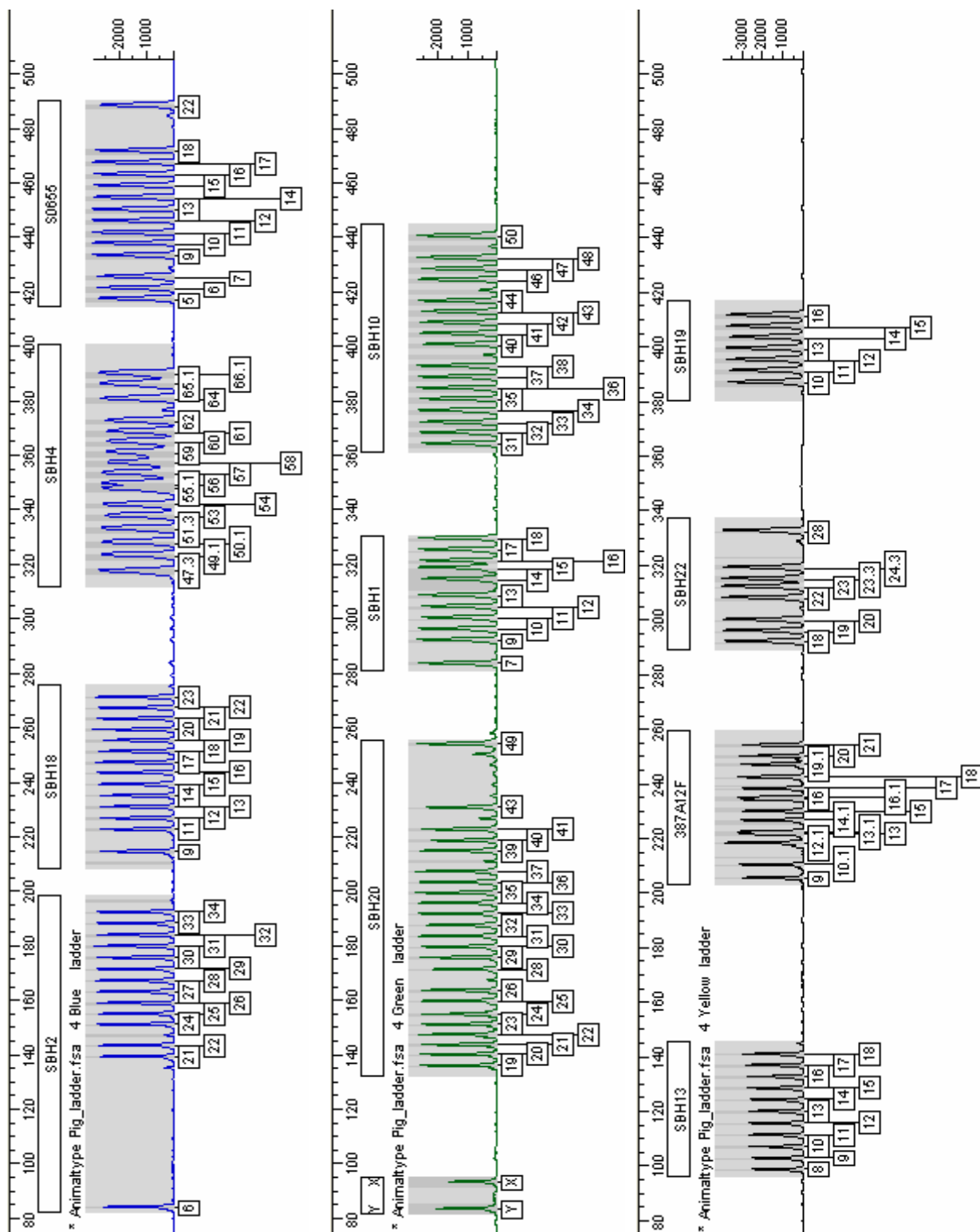


Abb. 8 Elektropherogramm der Allelleiter Animaltype **Pig**, analysiert am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Die Allelzuordnung wurde mit Hilfe der Genotyper® Software und dem Animaltype **Pig** Template File durchgeführt.

Tabelle 5. Fragmentlängen der Allelleiter Animaltype Pig gemessen am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (blauer Panel)

| Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* | Allele | Größe [bp] ABI 310 | Bemerkung* | Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* |
|--------------|-----------------------|-----------------|-------------|-----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|-----------------|
| SBH2 | 6-FAM | | SBH4 | 6-FAM | | S0655 | 6-FAM | |
| 6 | 84.0 | | 47.3 | 317.4 | ±1.0 bp ^b | 5 | 416.6 | |
| 21 | 139.2 | | 49.1 | 322.7 | ±1.0 bp ^b | 6 | 420.6 | |
| 22 | 143.2 | 23 ^a | 50.1 | 327.3 | ±1.0 bp ^b | 7 | 424.7 | |
| 24 | 151.0 | | 51.3 | 332.6 | ±1.0 bp ^b | 9 | 432.5 | |
| 25 | 154.9 | | 53 | 337.2 | ±1.0 bp ^b | 10 | 436.8 | |
| 26 | 158.9 | | 54 | 341.5 | ±1.0 bp ^b | 11 | 440.8 | |
| 27 | 163.0 | | 55.1 | 347.6 | ±1.0 bp ^b | 12 | 445.2 | |
| 28 | 167.1 | | 56 | 349.1 | ±1.0 bp ^b | 13 | 449.4 | |
| 29 | 171.3 | | 57 | 353.0 | ±1.0 bp ^b | 14 | 453.8 | |
| 30 | 175.5 | | 58 | 357.0 | ±1.0 bp ^b | 15 | 458.1 | |
| 31 | 179.7 | | 59 | 360.7 | ±1.0 bp ^b | 16 | 462.2 | |
| 32 | 183.9 | | 60 | 364.6 | ±1.0 bp ^b | 17 | 466.5 | |
| 33 | 188.0 | | 61 | 368.4 | ±1.0 bp ^b | 18 | 470.8 | |
| 34 | 192.2 | 35 ^a | 62 | 372.2 | ±1.0 bp ^b | 22 | 487.6 | |
| | | | 64 | 380.2 | ±1.0 bp ^b | | | |
| SBH18 | 6-FAM | | 65.1 | 385.8 | ±1.0 bp ^b | | | |
| 9 | 214.4 | | 66.1 | 389.7 | ±1.0 bp ^b | | | |
| 11 | 222.5 | | | | | | | |
| 12 | 226.6 | | | | | | | |
| 13 | 230.8 | | | | | | | |
| 14 | 235.0 | | | | | | | |
| 15 | 239.2 | | | | | | | |
| 16 | 243.5 | | | | | | | |
| 17 | 247.3 | | | | | | | |
| 18 | 251.3 | | | | | | | |
| 19 | 255.2 | | | | | | | |
| 20 | 259.2 | | | | | | | |
| 21 | 263.2 | | | | | | | |
| 22 | 267.1 | | | | | | | |
| 23 | 271.0 | | | | | | | |

Tabelle 6. Fragmentlängen Allelleiter Animaltype Pig gemessen am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (grüner Panel)

| Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* | Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| SBH23 | HEX | | SBH1 | HEX | |
| Y | 83.4 | | 7 | 283.8 | 8 ^a |
| X | 93.4 | X (94.4) ^b | 9 | 292.0 | |
| | | | 10 | 296.0 | |
| SBH20 | HEX | | 11 | 300.0 | |
| 19 | 136.0 | | 12 | 304.2 | |
| 20 | 139.9 | | 13 | 308.4 | |
| 21 | 143.6 | | 14 | 312.6 | ±2.0 bp ^b |
| 22 | 147.3 | | 15 | 316.8 | ±2.0 bp ^b |
| 23 | 151.1 | | 16 | 320.9 | |
| 24 | 154.8 | | 17 | 324.9 | |
| 25 | 159.7 | | 18 | 329.1 | |
| 26 | 163.6 | | | | |
| 28 | 171.2 | | SBH10 | HEX | |
| 29 | 175.5 | | 31 | 363.5 | |
| 30 | 179.5 | | 32 | 367.5 | |
| 31 | 183.5 | | 33 | 371.5 | |
| 32 | 187.5 | | 34 | 375.7 | |
| 33 | 191.6 | | 35 | 379.9 | |
| 34 | 195.6 | | 36 | 383.9 | |
| 35 | 199.4 | | 37 | 388.0 | |
| 36 | 203.3 | | 38 | 392.0 | 39 ^a |
| 37 | 207.3 | 38 ^a | 40 | 400.0 | |
| 39 | 214.8 | | 41 | 404.0 | |
| 40 | 218.6 | | 42 | 408.0 | |
| 41 | 222.6 | | 43 | 412.0 | |
| 43 | 230.6 | | 44 | 415.8 | 45 ^a |
| 49 | 254.1 | | 46 | 423.8 | |
| | | | 47 | 427.8 | |
| | | | 48 | 431.8 | 49 ^a |
| | | | 50 | 439.8 | |

Tabelle 7. Fragmentlängen der Allelleiter Animaltype Pig gemessen am ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (grüner Panel)

| Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* | Allele | Größe [bp] ABI 310 | Weitere Allele* |
|----------------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------|
| SBH13 | NED | | SBH22 | NED | |
| 8 | 98.7 | | 18 | 291.7 | |
| 9 | 102.8 | | 19 | 295.7 | |
| 10 | 107.0 | | 20 | 299.7 | |
| 11 | 111.2 | | 22 | 307.7 | |
| 12 | 115.6 | | 23 | 311.7 | |
| 13 | 119.9 | | 23.3 | 314.7 | 24 ^a |
| 14 | 124.2 | | 24.3 | 318.7 | 25 ^a , 25.3 ^a |
| 15 | 128.5 | | 28 | 332.3 | 27.3 ^a |
| 16 | 132.7 | | | | |
| 17 | 136.9 | | SBH19 | NED | |
| 18 | 140.9 | | 10 | 386.5 | |
| | | | 11 | 390.7 | |
| 387A12F | NED | | 12 | 394.7 | |
| 9 | 205.4 | | 13 | 399.0 | |
| 10.1 | 210.3 | 11 ^a | 14 | 403.0 | |
| 12.1 | 218.3 | | 15 | 407.0 | |
| 13 | 221.4 | | 16 | 411.0 | |
| 13.1 | 222.4 | | | | |
| 14.1 | 226.6 | 14 ^a | | | |
| 15 | 229.8 | 15.1 ^a | | | |
| 16 | 234.0 | | | | |
| 16.1 | 235.0 | | | | |
| 17 | 238.2 | 17.1 ^a | | | |
| 18 | 242.2 | | | | |
| 19.1 | 247.2 | | | | |
| 20 | 250.2 | | | | |
| 21 | 254.2 | | | | |

* **a.** Biotype Diagnostic GmbH (DNA pool), **b.** siehe Besonderheiten (Kapitel 5)

6. Interpretation der Ergebnisse

Durch die vorher beschriebene Auswertung mit automatischer Allelzuordnung wird eine genaue und zuverlässige Unterscheidung der Allele gewährleistet.

Überstrahlungen (Pull-up Peaks)

Es kann zu Überstrahlungen zwischen den Farbpanels kommen, wenn eine ungeeignete Matrix für die Analyse verwendet wurde oder die Peakhöhen außerhalb des linearen Detektionsbereiches, z. B. größer 3000 relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) liegen. Diese erscheinen an der gleichen Position wie spezifische Peaks in anderen Farbpanels (in der Regel mit niedrigeren Signalintensitäten). Um Überstrahlungen zwischen den Farbpanels zu vermeiden, sollten die Peakhöhen daher 3000 RFU nicht wesentlich überschreiten.

Stotterbanden (Stutter Peaks)

Das Auftreten von Stotterbanden hängt von der Sequenz und Anzahl der Wiederholungseinheiten ab. Bei Tetranukleotid STR Motiven entstehen während der PCR n-4 Peaks durch Fehler der Taq DNA-Polymerase. Wiederholungseinheiten werden innerhalb des STR übersprungen. Zur Bewertung der Peaks gelten die Vorgaben der Template Files für die Genotyper[®] und GeneMapper[™] ID Software.

Template-unabhängige Anheftung von Nukleotiden

Die Taq DNA Polymerase hängt aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität bevorzugt ein Adenosin an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments an. Wenn dem PCR-System nicht genügend Zeit für die Extension zur Verfügung steht oder wenn die Primersequenzen die Extension nicht begünstigen, findet diese Anheftung nicht statt. Dieses Artefakt ist durch das Auftreten eines um eine Base verkürzten Fragments (-1 Peak) erkennbar. Alle Biotype[®] Primer sind so gestaltet, dass diese Artefaktbildung minimiert wird. Zusätzlich wird die Bildung des Artefakts durch den abschließenden Extensionsschritt im PCR-Protokoll (70°C für 60 min) reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts nimmt bei hohen DNA Mengen zu. Zur Bewertung der Peaks sollte jedes Analyselabor hierfür eigene Grenzwerte festlegen.

Referenzen

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* 110: 175-176.

Kiuchi S, Inage Y, Hiraiwa H, Uenishi H, Yasue H (2002) Assignment of 280 swine genomic inserts including 31 microsatellites from BAC clones to the swine RH map (IMpRH map). *Mamm. Genome* 13: 80-88.

Nechtelberger D, Kaltwasser C, Stur I, Meyer JN, Brem G, Mueller M, Mueller S (2001) DNA microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Anim Biotechnol* 12: 141-144.

Renard C, Vaiman M, Chiannikulchai N, Cattolico L, Robert C, Chardon P (2001) Sequence of the pig major histocompatibility region containing the classical class I genes. *Immunogenetics* 53: 490-500.

Notizen