

# Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> PCR Amplification Kit

## **Produktbeschreibung**

Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> PCR Amplification Kit ist eine Multiplex-Anwendung für besondere Fragestellungen im humanmedizinischen Bereich. Das Kit wurde speziell entwickelt um das Anwachsen von Spenderzellen nach Knochenmarktransplantation zu kontrollieren, was durch Chimärismusanalysen bei über 200 HLA-abgestimmten Spender- und Empfängerpaaren validiert wurde.

Mit dem Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> PCR Amplification Kit werden die zwölf hochpolymorphen autosomalen Loci **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** und der geschlechtsspezifische **Amelogenin**-Locus simultan in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM, BTG** oder **BTY** markiert.

Die Nachweisgrenze für das Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> PCR Amplification Kit liegt bei **200 pg genomischer DNA**. Der optimale Bereich ist unter Standardbedingungen **0.2-1.0 ng DNA**. Interne Validierungen haben gezeigt, dass interpretierbare Ergebnisse auch mit <0.1 ng DNA erzielt werden.

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurden am GeneAmp<sup>®</sup> 9700 Thermocycler, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra, ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer und ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb der Biotype<sup>®</sup> Produkte ist zertifiziert nach DIN EN ISO 9001:2008.

**Inhaltsverzeichnis**

1. Beschreibung des Mentype® Chimera® .....	3
2. PCR Amplifikation.....	6
2.1 Ansatz des Master Mixes.....	6
2.2 PCR Amplifikationsparameter.....	7
3. Elektrophorese am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer .....	8
3.1 Matrixerstellung .....	8
3.2 Probenvorbereitung.....	11
3.3 Einstellung der GeneScan® Software.....	11
3.4 Analyse Parameter .....	12
4. Elektrophorese am ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer .....	13
4.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung.....	13
4.2 Probenvorbereitung.....	15
4.3 Einstellung der GeneScan® Software.....	16
4.4 Analyse Parameter .....	17
5. Elektrophorese am ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer.....	18
5.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung.....	18
5.2 Probenvorbereitung.....	21
5.3 Einstellung der GeneMapper™ ID Software .....	22
5.4 Analyse Parameter / Analysis Method.....	24
6. Auswertung .....	25
6.1 Biotype® Auswertevorlagen .....	26
6.2 Kontrollen.....	27
6.3 Fragmentlängen und Allele .....	27
7. Interpretation der Ergebnisse .....	33
8. Populationsgenetische Daten .....	34
9. Referenzen .....	37

## 1. Beschreibung des Mentype® Chimera®

**Tabelle 1. Locus-spezifische Informationen für Mentype® Chimera®**

Locus	GenBank® Accession	Repeatmotiv des Referenz Alleles	Referenz Allel	Allel- Bereich
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] <sub>9</sub> [TGTC] <sub>9</sub> [TATC] <sub>5</sub>	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] <sub>2</sub> TA [TCTA] <sub>12</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub>	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] <sub>9</sub> ATTG [ATAG] <sub>2</sub>	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] <sub>12</sub>	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] <sub>5</sub> TGA [TAGA] <sub>12</sub>	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] <sub>11</sub> CAAA [GAAA] <sub>2</sub> CAAA [GAAA] <sub>2</sub>	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] <sub>9</sub> TCA [TCTA] <sub>9</sub> TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] <sub>12</sub>	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] <sub>13</sub>	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] <sub>2</sub> CTA [CTAT] <sub>9</sub> CTA [CTAT] <sub>3</sub> TAT [CTAT] <sub>3</sub> TAT [CTAT] <sub>4</sub> CAT [CTAT] <sub>2</sub>	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>	25.2	3-50

Tabelle 1 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). Für die STR Loci D8S1132 und D12S391 gilt die Nomenklatur nach S Hering und E Müller (2001), für die Loci D4S2366 und D6S474 die nach Becker et al. (2007), für den Locus D10S2325 die nach Wiegand et al. (1999) und für den Locus D7S1517 gilt die Nomenklatur nach P Wiegand und M Klitschar (2002). Der angegebene Allelbereich berücksichtigt die bekannten Allele des National Institute of Standards and Technology (NIST, Stand 12/2008) sowie die aktuelle Literatur.

**Tabelle 2. Chromosomale Kartierung für Mentype® Chimera®**

Locus	Chromosomale Kartierung
Amelogenin X	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	Yp11.2
D2S1360	2p24-p22
D3S1744	3p24
D4S2366	4p16-15.2
D5S2500	5q11.2
D6S474	6q21-22
D7S1517	7q31.33
D8S1132	8q23.1
D10S2325	10p12
D12S391	12p13.2
D18S51	18q21.3
D21S2055	21q22
SE33	6q14.2

## Inhalt

### Mentype<sup>®</sup> **Chimera**<sup>®</sup> PCR Amplification Kit (100 Reaktionen)

Nuklease-freies Wasser / Nuclease-free water	3.0 mL
Reaktionsgemisch <b>A</b> / Reaction mix <b>A</b>	500 µL
Primergemisch / Primer mix	250 µL
DNA Polymerase / DNA polymerase	40 µL
Kontroll-DNA XY5 / Control DNA XY5 (2 ng/µL)	10 µL
DNA Längenstandard 550 (BTO) / DNA Size Standard 550 (BTO)	50 µL
Allelleiter / Allelic ladder	25 µL

## Bestellinformation

Mentype <sup>®</sup> <b>Chimera</b> <sup>®</sup>	25	Reaktionen	Artikelnummer	45-13210-0025
Mentype <sup>®</sup> <b>Chimera</b> <sup>®</sup>	100	Reaktionen	Artikelnummer	45-13210-0100
Mentype <sup>®</sup> <b>Chimera</b> <sup>®</sup>	400	Reaktionen	Artikelnummer	45-13210-0400
Mentype <sup>®</sup> <b>Chimera</b> <sup>®</sup>	1000	Reaktionen	Artikelnummer	45-13210-1000

## 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.

## Zusätzliche Reagenzien

Für die Amplifikation und Probenvorbereitung benötigen Sie neben den im Biotype<sup>®</sup> Testkit enthaltenen Bestandteilen folgende Reagenzien:

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Hi-Di <sup>™</sup> Formamide, 25 mL	Applied Biosystems	4311320
Matrix Standards BT5 single-capillary instruments (5x25 µL)	Biotype Diagnostic GmbH	00-10411-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (25 µL)	Biotype Diagnostic GmbH	00-10421-0025
Matrix Standards BT5 multi-capillary instruments (50 µL)	Biotype Diagnostic GmbH	00-10421-0050

## Warnungen und Sicherheitshinweise

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem Testkit enthalten:

<b>Kitbestandteil</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Gefahr</b>
Reaktionsgemisch und Allelleiter	Natriumazid $\text{NaN}_3$	giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

Bitte beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt.

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

## Qualitätssicherung

Der gesamte Inhalt des 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.

## Warenzeichen und Patente

Mentype<sup>®</sup>, Chimera<sup>®</sup> sind eingetragene Warenzeichen der Biotype Diagnostic GmbH. GenoProof<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen der Qualitytype AG.

ABI PRISM<sup>®</sup>, GeneScan<sup>®</sup>, Genotyper<sup>®</sup> GeneMapper<sup>™</sup> und Applied Biosystems sind eingetragene Warenzeichen der Applied Biosystems Inc.

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

GeneAmp<sup>®</sup> 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).

GenBank<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen vom National Institute of Health.

## Protokolle für die Amplifikation, Elektrophorese und Auswertung

### 2. PCR Amplifikation

#### 2.1 Ansatz des Master Mixes

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der eingesetzten Kitbestandteile bei 1.0 µL 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.

Komponente	Volumen
Nuklease-freies Wasser	16.1 µL
Reaktionsgemisch <b>A*</b>	5.0 µL
Primergemisch	2.5 µL
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2.5 U/µL)	0.4 µL
Volumen des Master Mixes	24.0 µL

\* enthält Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, BSA

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

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration. Für Vergleichsproben ist meist 1 µL ausreichend. Für kritische Patientenproben kann die Templatemenge entsprechend erhöht 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 bei **30 PCR-Zyklen** mit **0.5 ng Kontroll-DNA XY5** in einem Reaktionsvolumen von 25 µL 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 XY5 auf 0.5 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.

#### Template DNA

In Abhängigkeit von der angewandten Quantifizierungsmethode kann der Messwert der DNA-Konzentration variieren, so dass die optimale DNA-Menge ggf. anzugleichen ist.

## 2.2 PCR Amplifikationsparameter

Um die Multi Taq2 DNA Polymerase zu aktivieren und die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten zu unterdrücken, sollte unbedingt ein „hot start“ durchgeführt werden.

Die Zyklenzahl ist abhängig von der DNA-Menge. Für alle Proben werden 30 PCR-Zyklen empfohlen. Für kritisches Material (< 100 pg DNA) werden optional 32 Zyklen empfohlen, um optimale Signalintensitäten zu erreichen.

### Standard Methode

Empfohlen für alle DNA-Proben

Temperatur	Zeit	
94°C	4 min (hot start für Aktivierung der Multi Taq2 DNA Polymerase)	
94°C	30 s	<b>30 Zyklen</b>
60°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	
10°C	∞	bis zum Ende

### Optional

Empfohlen für geringe DNA-Mengen

Temperatur	Zeit	
94°C	4 min (hot start für Aktivierung der Multi Taq2 DNA Polymerase)	
94°C	30 s	<b>32 Zyklen</b>
60°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	
10°C	∞	bis zum Ende

**Anmerkung:** Für eine optimale Kitbalance empfehlen wir bei PCR-Geräten mit schnellen Heiz- und Kühlraten (> 2°C/s) das Ramping auf maximal 2°C/s einzustellen.

Aufgrund zu geringer DNA-Mengen kann es zu statistischen Ausfällen (Allelic Dropouts) und unausgewogenen Peakhöhen kommen. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Amplifikationsprodukten. Mit zunehmender Zyklenzahl können zudem Kreuzkontaminationen durch minimale Mengen an Fremd-DNA auftreten.

### 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 fünf Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, BTG, BTY, BTR** und **BTO** (der Matrix Standard wird im Folgenden als **BT5** bezeichnet) ist die Nutzung des virtuellen **Filter Sets G5** vorgesehen.

#### Material

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

#### 3.1 Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse mit dem Filter Set G5 muss zunächst eine Matrix mit PCR-Fragmenten der entsprechenden fünf Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO für das jeweilige Analysegerät erstellt werden.

Farbe	Matrix Standard
Blau (B)	6-FAM
Grün (G)	BTG
Gelb (Y)	BTY
Rot (R)	BTR
Orange (O)	BTO

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

Matrix Probe	Komponente	Volumen
Matrix Probe 1	Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
	Matrix Standard <b>6-FAM</b>	1.0 µL
Matrix Probe 2	Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
	Matrix Standard <b>BTG</b>	1.0 µL
Matrix Probe 3	Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
	Matrix Standard <b>BTY</b>	1.0 µL
Matrix Probe 4	Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
	Matrix Standard <b>BTR</b>	1.0 µL
Matrix Probe 5	Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
	Matrix Standard <b>BTO</b>	1.0 µL

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

- Probenliste **Sample Sheet** erstellen, **5 Dyes** auswählen und Proben bezeichnen

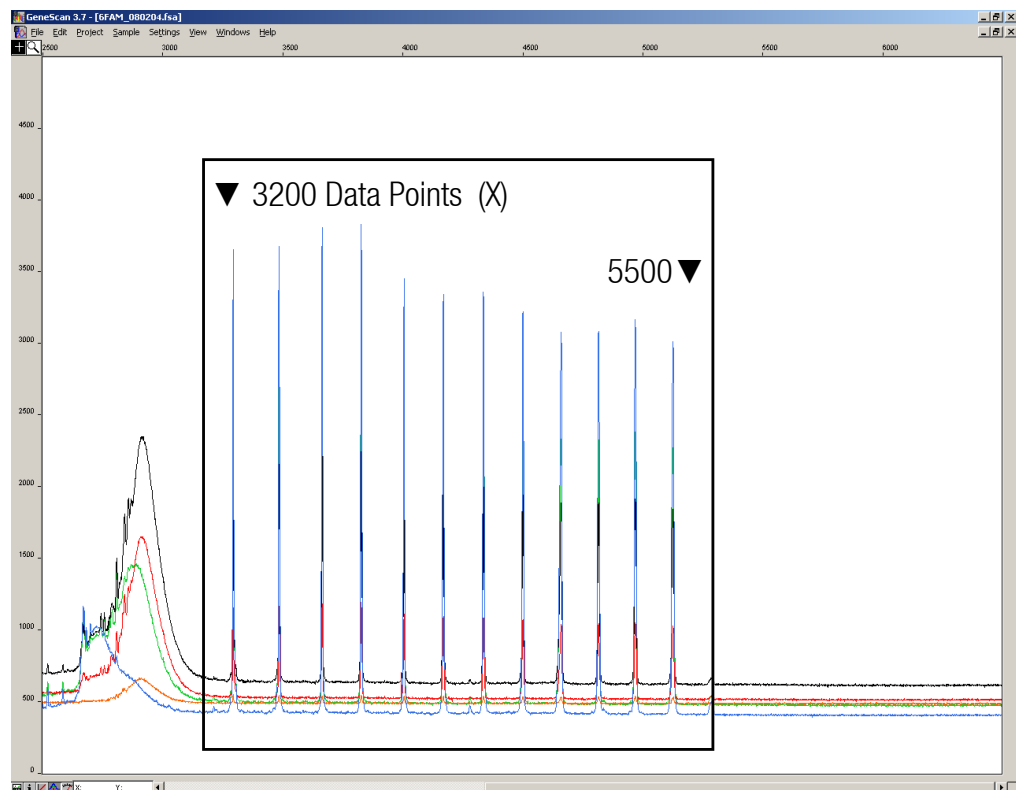
## Injektionsliste für die Matrixerstellung

Parameter	Einstellung
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) <b>G5</b>
Matrix File	<b>NONE</b>
Size Standard*	<b>NONE</b>
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 (BTO)** vorzubereiten

## Analyse der Matrix Proben

- Starten der GeneScan® 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. Wie in der Abbildung gezeigt sollten mindestens fünf Peaks mit Peakhöhen von 1000-4000 (Y-Achse) in jeder Matrix Probe erkennbar sein (optimaler Bereich: 2000-4000)

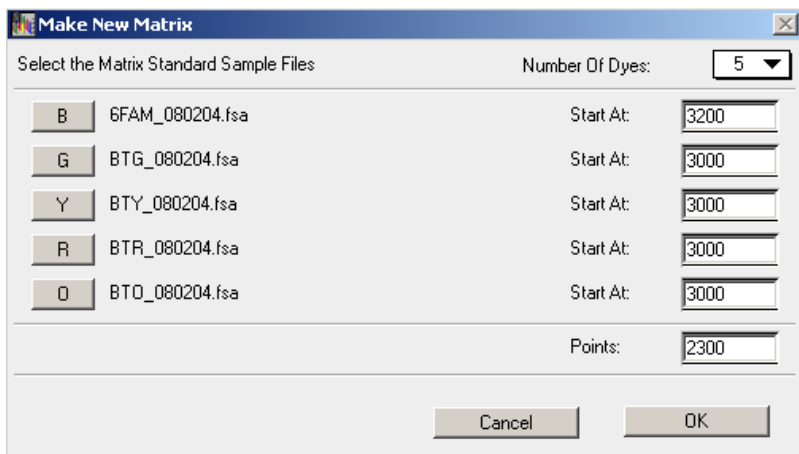


**Abb. 1** Elektropherogramm der Rohdaten des Matrix Standards 6-FAM

- 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 3200, Endwert 5500
- Differenzwert berechnen, z.B.  $5500 - 3200 = 2300$  Data Points

## Neue Matrix erstellen

- **File** → **New** → **Matrix**



**Abb. 2** Matrix Proben auswählen

- Matrix Proben für jede Farbe (B, G, Y, R, O) importieren
- Jeweiligen Anfangspunkt bei **Start At** eintragen, z.B. 3200
- Errechneten Differenzwert z.B. 2300 bei **Points** eintragen
- Nach der Bestätigung mit **OK** wird die neue Matrix berechnet

	Reactions				
	B	G	Y	R	O
B	1.0000	0.1811	0.0051	0.0418	0.0006
G	0.6891	1.0000	0.2056	0.3259	0.0017
Y	0.4687	0.8068	1.0000	0.9119	0.0029
H	0.1944	0.3619	0.5311	1.0000	0.0095
O	0.0160	0.0304	0.0477	0.2082	1.0000

**Abb. 3** Neue Matrix BT5

- Speichern im Matrix Ordner: **File** → **Save As**, z.B. Matrix BT5

## 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 sollten **keine** Überstrahlungen (Pull-up Peaks) zwischen den verschiedenen Farbpaneln (B, G, Y, R, O) auftreten.

### 3.2 Probenvorbereitung

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
DNA Längenstandard 550 (BTO)	0.5 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 (BTO) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Analyse

### 3.3 Einstellung der GeneScan® Software

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

### Injektionsliste

Parameter	Einstellung
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) <b>G5</b>
Matrix File	z.B. Matrix BT5
Size Standard	z.B. SST-BTO_60-500bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]**	<b>28</b>

\* 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 geringen DNA Mengen bzw. kritischem Patientenmaterial können bis zu 10 s notwendig sein.

\*\* Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Mentype® **Chimera**® angepasst 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:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 pts**
Size Call Range	Min: 60 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 Grundrauschen der Basislinie.

\*\* Gelegentlich können Punktallele, d.h. Allele mit einem Abstand von mindestens 1 bp zum nächsten ganzzahligen Allel, nicht unterschieden werden. Falls notwendig kann die Peak Window Size noch weiter verringert werden.

#### 4. Elektrophorese am ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, zur Spektralkalibrierung und der Anwendung der ABI PRISM® 3100 Data Collection Software Version 1.01 oder 1.1 sowie der GeneScan® Software können dem entsprechenden *ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual* entnommen werden.

Das 4-Kapillarsystem trägt die Bezeichnung ABI 3100-Avant, das 16-Kapillarsystem heißt ABI 3100.

Für den kombinierten Einsatz der fünf Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, BTG, BTY, BTR** und **BT0** (der Matrix Standard wird im Folgenden als **BT5** bezeichnet) ist die Nutzung des virtuellen **Filter Sets G5** vorgesehen.

##### Material

Kapillare	36 cm Capillary Array for 3100-Avant/3100
Polymer	POP-4 Polymer for 3100
Puffer	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

#### 4.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse muss zunächst eine Spektralkalibrierung am ABI PRISM® 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer durchgeführt werden. Auf diese Weise wird eine Matrix erstellt, die das Überlappen der farbspezifischen Fluoreszenzemissionsspektren korrigiert.

Die Spektralkalibrierung gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

- Vorbereitung der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung
- Laden der Standards in die 96-Lochplatte (je Kapillare eine Probe)
- Plattenzusammensetzung eingeben
- Durchführung des Laufs zur Spektralkalibrierung und prüfen der Matrix

#### Vorbereitung der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung

Beispiel für 4 Kapillaren/ABI 3100-Avant

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	60.0 µL
Matrix Standard <b>BT5</b>	5.0 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte laden, z.B. Position **A1-D1**
- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C

Beispiel für 16 Kapillaren/ ABI 3100

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	204.0 µL
Matrix Standard <b>BT5</b>	17.0 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte laden, z.B. Position **A1-H1** und **A2-H2**
- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C

## Durchführung der Spektralkalibrierung

Um eine erfolgreiche Kalibrierung mit der Data Collection Software Version 1.0.1 oder 1.1 durchzuführen, muss zunächst einmalig die **Parameter** Datei für **DyeSetG5** verändert werden.

### Spectral Parameter

- Änderung der Parametereinstellungen unter dem Pfad:  
D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection Support Files\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles
- **MtxStd{Genescan\_SetG5}** auswählen, um die PAR-Datei zu öffnen
- Änderung des **Condition bounds range** auf [1.0;20.0]. Falls eine Kalibrierung nicht möglich ist, können im zweiten Schritt zusätzlich die Parameter **Sensitivity** auf 0.1 und **Quality** auf 0.8 geändert werden
- **File Save As** auswählen, um die Parameter Datei unter einem neuen Namen zu speichern, z.B. MtxStd{Genescan\_SetG5\_BT5}.par

Verwenden Sie für die Spektralkalibrierung mit Biotype<sup>®</sup> Matrix Standards **BT5** immer die soeben erstellte Parameter Datei.

### Platteneditor zur Spektralkalibrierung (I)

- Die vorbereitete 96-Lochplatte in den Autosampler setzen
- Öffnen der ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Data Collection Software
- Im **Plate View** der 3100 Data Collection Software auf **New** klicken, um den **Plate Editor Dialog** zu öffnen
- Name der Platte eingeben
- **Spectral Calibration** auswählen
- **96-Well** als Plattentyp auswählen und **Finish** wählen

### Platteneditor zur Spektralkalibrierung (II)

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Matrixproben
Dye Set	G5
Spectral Run Module	<i>Default</i> (z.B. Spect36_POP4)
Spectral Parameters	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (Parameter zuvor erstellt)

- In die oberste Zelle der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen, über **Edit** → **Fill Down** die Informationen den ausgewählten Matrixproben zufügen und mit **OK** bestätigen
- Verknüpfen der 96-Lochplatte auf dem Autosampler mit der soeben erstellten Plattenbezeichnung und den Lauf starten
- Nach dem Lauf unter **Spectral Calibration Result** prüfen, ob alle Kapillaren erfolgreich kalibriert wurden (Kennzeichnung **A**). Bei Kennzeichnung **X** sind die Anweisungen im *ABI PRISM<sup>®</sup> Genetic Analyzer User's Manual* zu beachten
- Auf **OK** klicken, um den Lauf zu bestätigen

## Matrix prüfen

- Wähle **Tools** → **Display Spectral Calibration** → **Dye Set** → **G5**, um die Spektralkalibrierung jeder Kapillare zu kontrollieren
- Jede Kapillare sollte einen Qualitätswert (**Q Value**) von mindestens 0.95 sowie eine Konditionszahl (**C Value**) zwischen 1 und 20 haben, beide Werte müssen im zuvor festgelegten Bereich liegen
- Bewerten, ob eine stabile Basislinie vorhanden ist. Es müssen fünf Peaks mit Peakhöhen von 1000-5000 (Y-Achse) in jeder Kapillare erkennbar sein (optimaler Bereich: 2000-4000)
- Bitte überprüfen Sie die neue Matrix mit Ihren aktuellen Proben. Mit der neuen Matrix sollten **keine** Überstrahlungen (Pull-up Peaks) zwischen den verschiedenen Farbpanels (B, G, Y, R, O) auftreten
- War die Kalibrierung nicht erfolgreich, ändern Sie bitte die Werte für **Sensitivity** und **Quality** wie zuvor in der Parameter Datei beschrieben
- Haben alle Kapillaren die Kalibrierung erfolgreich durchlaufen, muss die aktuelle Kalibrierungsdatei für das **Dye Set G5** unter **Tools** → **Set Active Spectral Calibration** manuell aktiv gesetzt werden. Eine Umbenennung ist über **Set Matrix Name** möglich (z.B. BT5\_Datum der Kalibrierung)

## 4.2 Probenvorbereitung

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
DNA Längenstandard 550 (BTO)	0.5 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 an allen Kapillaren stattfindet, müssen am Mehrkapillargerät immer 4 oder 16 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 Mehrkapillargerät zu gewährleisten, sollten unabhängig von der Probenanzahl mehrere Allelleitern 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.

## Signalintensitäten

Möglichkeiten zur Erhöhung der Signalintensitäten:

- Reduzierung des Anteiles am DNA Längenstandard 550 (BTO) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR Produkte vor der Analyse

### 4.3 Einstellung der GeneScan® Software

Vor dem ersten Lauf muss das voreingestellte Run Modul im **Dye Set G5** einmalig editiert werden:

- Zum Öffnen der Dialog Box auf **Module Editor** klicken
- Aus der Tabelle **GeneScan** das entsprechenden **Run Module** als Vorlage auswählen
- Ändern Sie die Spannung (**Injection Voltage**) auf 3 kV und die Injektionszeit (**Injection Time**) auf 10 s

#### Run Modul 3kV\_10s\_500bp

Parameter	Einstellung
Run Temperature [°C]	Default
Cap Fill Volume	Default
Maximum Current [A]	Default
Current Tolerance [A]	Default
Run Current [A]	Default
Voltage Tolerance [kV]	Default
Pre Run Voltage [kV]	Default
Pre Run Time [s]	Default
Injection Voltage [kV]	<b>3.0</b>
Injection Time [s]*	<b>10</b>
Run Voltage [kV]	Default
Number of Steps	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time [s]	Default
Run Time [min]**	<b>26</b>

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

\*\* Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Mentype® **Chimera**® angepasst 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. 3kV\_10s\_500bp) und mit **OK** bestätigen
- Zum Verlassen des **Run Module Editors** auf **Close** klicken

#### Run starten

- Die vorbereitete 96-Lochplatte in den Autosampler setzen
- Öffnen der ABI PRISM® 3100 Data Collection Software
- Im **Plate View** der 3100 Data Collection Software auf **New** klicken, um den Plate Editor Dialog zu öffnen
- **GeneScan** auswählen
- **96-Well** als Plattentyp auswählen und **Finish** anklicken

## Platteneditor

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Proben
Dyes	0
Colour Info	Ladder or Sample
Project Name	z.B. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module*	3kV_10s_500bp
Analysis Module 1	DefaultAnalysis.gsp

\* Parameter siehe oben

- Vervollständigen der Tabelle im **Plate Editor** und **OK** wählen
- In die oberste Zelle der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen und **Edit** → **Fill Down** wählen, um die Informationen der ausgewählten Probe zuzuordnen
- Verknüpfen der 96-Lochplatte auf dem Autosampler mit der soeben erstellten Plattenbezeichnung und den Lauf starten
- Nach dem Lauf sind die Daten als **Color Data** in **Array View** der 3100 Data Collection Software oder als **Analyzed Sample Files** unter dem Pfad `D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns` vorzufinden

## 4.4 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:* O:* Min. Peak Half Width: 2 pts Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 pts**
Size Call Range	Min: 60 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, nicht unterschieden werden. Falls notwendig kann die Peak Window Size noch weiter verringert werden.

## 5. Elektrophorese am ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, zur Spektralkalibrierung und der Anwendung der ABI PRISM® Data Collection Software Version 3.0 und der GeneMapper™ ID Software können der entsprechenden Anleitung *ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide* entnommen werden.

Das 4-Kapillarsystem trägt die Bezeichnung ABI 3130, das 16-Kapillarsystem heißt ABI 3130xl.

Für den kombinierten Einsatz der fünf Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, BTG, BTY, BTR** und **BTO** (der Matrix Standard wird im Folgenden als **BT5** bezeichnet) ist die Nutzung des virtuellen **Filter Sets Any5Dye** vorgesehen.

### Material

Kapillare	36 cm Capillary Array for 3130/3130xl
Polymer	POP-4 Polymer for 3130
Puffer	10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA

### 5.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse muss zunächst eine Spektralkalibrierung mit PCR-Fragmenten der entsprechenden fünf Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO 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:

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

## Vorbereitung der Matrix Standards zur Spektralkalibrierung

Beispiel für 4 Kapillaren/ABI 3130

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	60.0 µL
Matrix Standard <b>BT5</b>	5.0 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte laden, z.B. Position **A1-D1**
- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C

Beispiel für 16 Kapillaren/ABI 3130xl

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	204.0 µL
Matrix Standard <b>BT5</b>	17.0 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte laden, z.B. Position **A1-H1** und **A2-H2**
- 3 min denaturieren bei 95°C
- abkühlen auf 4°C

## Durchführung der Spektralkalibrierung

- Die vorbereitete 96-Lochplatte 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	Einstellung
Name	User (z.B. Spectral36_POP4_BT5)
Type	SPECTRAL
Dye Set	Any5Dye
Polymer*	User (z.B. POP4)
Array Length*	User (z.B. 36cm)
Chemistry	Matrix Standard
Run Module*	Default (z.B. Spect36_POP4_1)

\* Richtet sich nach dem verwendeten Polymertyp und der Kapillarlänge

- **OK** wählen, um den **Protocol Editor** zu verlassen
- Im **Plate Manager** der Data Collection Software auf **New** klicken, um **New Plate Dialog** zu öffnen

## Platteneditor zur Spektralkalibrierung (I)

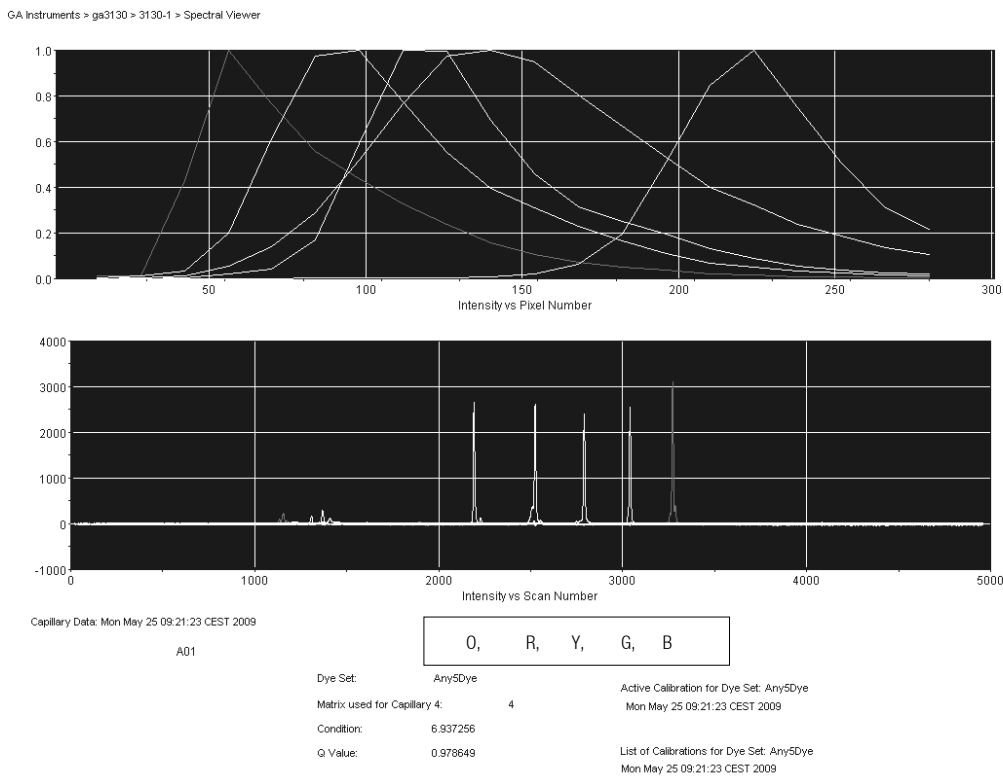
New Plate Dialog	Einstellung
Name	z.B. Spectral_BT5_Datum
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well
Owner Name / Operator Name	...

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

## Platteneditor zur Spektralkalibrierung (II)

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Matrixproben
Priority	z.B. 100
Instrument Protocol 1	Spectral36_POP4_BT5 (Einstellung zuvor beschrieben)

- In die oberste Zelle der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen, über **Edit** → **Fill Down** diese Information 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



**Abb. 4** Elektropherogramm der Spektralkalibrierung mit Matrix Standards BT5 am ABI 3130

## Matrix prüfen

- Jede Kapillare sollte einen Qualitätswert (**Q Value**) von mindestens 0.95 sowie eine Konditionszahl (**Condition number range**) zwischen 1 und 20 haben
- Bewerten, ob eine stabile Basislinie vorhanden ist. Es müssen fünf Peaks mit Peakhöhen von 1000-5000 (Y-Achse) in jeder Kapillare erkennbar sein (optimaler Bereich: 2000-4000), siehe Abbildung
- Bitte überprüfen Sie die neue Matrix mit Ihren aktuellen Proben. Mit der neuen Matrix sollten **keine** Überstrahlungen (Pull-up Peaks) zwischen den verschiedenen Farbpanels (B, G, Y, R, O) auftreten.
- War die Kalibrierung nicht erfolgreich, ist eine Wiederholung der Spektral-kalibrierung mit optimierten Werten notwendig

- Haben alle Kapillaren die Kalibrierung erfolgreich durchlaufen, wird die Kalibrierungsdatei für das **Any5Dyes** im **Spectral Viewer** automatisch aktiv gesetzt. Eine Umbenennung ist über **Rename** möglich (z.B. BT5\_Datum der Kalibrierung)

## 5.2 Probenvorbereitung

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	12.0 µL
DNA Längenstandard 550 (BTO)	0.5 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 an allen Kapillaren stattfindet, müssen am Mehrkapillargerät immer 4 oder 16 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 Mehrkapillargerät zu gewährleisten, sollten unabhängig von der Probenanzahl mehrere Allelleitern 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.

## Signalintensitäten

Möglichkeiten zur Erhöhung der Signalintensitäten:

- Reduzierung der Anteile am DNA Längenstandard 550 (BTO) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Analyse

### 5.3 Einstellung der GeneMapper™ ID Software

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 3kV\_10s\_500bp

Parameter	Einstellung
Oven Temperature [°C]	Default
Poly Fill Volume	Default
Current Stability [µA]	Default
PreRun Voltage [kV]	Default
PreRun Time [s]	Default
Injection Voltage [kV]	<b>3.0</b>
Injection Time [s]*	<b>10</b>
Voltage Number of Steps	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time [s]	Default
Run Voltage [kV]	Default
Run Time [s]**	<b>1560</b>

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

\*\* Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Mentype® **Chimera**® angepasst 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. 3kV\_10s\_500bp) und mit **OK** bestätigen
- Zum Verlassen des **Run Module Editors** auf **Close** klicken

#### Run starten

- Die vorbereitete 96-Lochplatte 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	Einstellung
Name	z.B. Run36_POP4_BT5_26min
Type	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_500bp
Dye Set	Any5Dye

\* Parameter siehe oben

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

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	Einstellung
Name	z.B. Plate_BT5_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 (II)

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Probe
Priority	z.B. 100 (Voreinstellung)
Sample Type	Probe oder Allelleiter
Size Standard	z.B. SST-BTO_60-500bp
Panel	z.B. Chimera_Panels_v0
Analysis Method	z.B. Analysis_HID_3130
Snp Set	-
User-defined 1-3	-
Results Group 1	(Results Group auswählen)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_26min (Einstellung zuvor beschreiben)

- In die obersten Zellen der Tabelle klicken, um die gesamte Spalte auszuwählen, über **Edit** → **Fill Down** diese Informationen den ausgewählten Proben zufügen 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** beobachten 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

## 5.4 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:* O:* 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 Grundrauschen der Basislinie.

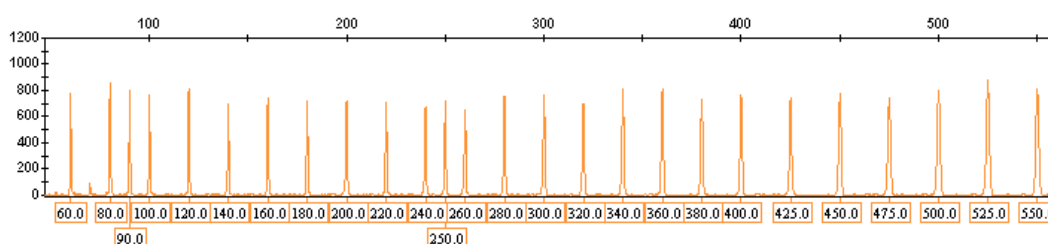
\*\* Gelegentlich können Punktallele, d.h. Allele mit einem Abstand von mindestens 1 bp zum nächsten ganzzahligen Allel, nicht unterschieden werden. Falls notwendig kann die Peak Window Size noch weiter verringert werden.

## 6. Auswertung

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

**Anmerkung:** Bei der Auswertung des Mentype® **Chimera**® sollte der rote Panel ausgeblendet 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 (BTO) mit den Fragmentlängen **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525 und 550 bp.**



**Abb. 5** Elektropherogramm des DNA Längenstandard 550 (BTO), Fragmentlängen in bp

**Anmerkung:** Für die Auswertung und Analyse des Mentype® **Chimera**® mit der *GeneMapper™ ID Software* kann die bereitgestellte Auswertevorlage des DNA-Längenstandards SST-BTO\_60-500bp verwendet werden.

## 6.1 Biotype<sup>®</sup> Auswertevorlagen

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

Die empfohlenen Biotype<sup>®</sup> Vorlagen für die GeneMapper™ ID/ID-X Software sind:

Panels	Chimera_Panels_v0/v0X	oder höhere Version
BinSets	Chimera_Bins_v0/v0X	oder höhere Version
Size Standard	SST-BTO_60-500bp	
Analysis Method	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu	
Plot Settings	PlotsBT5_4dyes	
Table Settings	Table for 2 Alleles Table for 10 Alleles	

Die Panels und BinSets müssen immer verwendet werden, die weiteren Auswertevorlagen sind optional.

Zusätzliche Biotype<sup>®</sup> Vorlagen für die GeneMapper™ ID-X Software:

Stutter*	Chimera_Stutter_v0X	oder höhere Version
----------	---------------------	---------------------

\* Beim Laden der oben genannten Panels werden die Stuttereinstellungen nicht akzeptiert, die Stutterdatei muss daher extra importiert werden.

Die empfohlenen Biotype<sup>®</sup> Vorlagen für die Genotyper<sup>®</sup> Software sind:

Mentype_Chimera_v0	oder höhere Version
--------------------	---------------------

### 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. Probanddaten auswerten

## 6.2 Kontrollen

Die im PCR Amplification Kit enthaltene Kontroll-DNA XY5 sowie kommerziell erhältliche DNAs repräsentieren folgende Allele:

**Tabelle 3. Allelzuordnungen mit Mentype® Chimera®**

<b>Locus</b>	<b>Kontroll-DNA XY5</b>	<b>ATCC K-562</b>	<b>CCR 9947A</b>	<b>CCR 9948</b>	<b>CCR 3657</b>
Amelogenin	X/Y	X/X	X/X	X/Y	X/Y
D2S1360	22/25	20/28	23/24	22/25	22/23
D3S1744	17/18	18/18	17/17	18/18	14/17
D4S2366	9/12	13/13	11/13	9/14	9/14
D5S2500	10/11	15/15	15/16	11/15	11/16
D6S474	15/16	14/17	13/17	16/16	15/16
D7S1517	22/27	21/24/25	19/25	20/22	24/25
D8S1132	18/20	20/24	19/21	20/24	17/18
D10S2325	13/14	7/13	9/10	8/14	9/14
D12S391	17/19	23/23	18/20	18/24	18/19
D18S51	13/15	15/16	15/19	15/18	12/20
D21S2055	25/27	28/35	19.1/26	19.1/26	19.1/25
SE33	15/21.2	26.2/28.2	19/29.2	23.2/26.2	22.2/27.2

In der Tabelle sind die Allele von Referenz-DNA aufgezeigt, die bei ATCC (<http://www.atcc.org/Products/PurifiedDNA.cfm#celllines>) bzw. bei Coriell Cell Repositories (CCR; <http://locus.umdnj.edu/nigms>) erhältlich sind. Damit wird den Anforderungen von Szibor et al. (2003) entsprochen.

## 6.3 Fragmentlängen und Allele

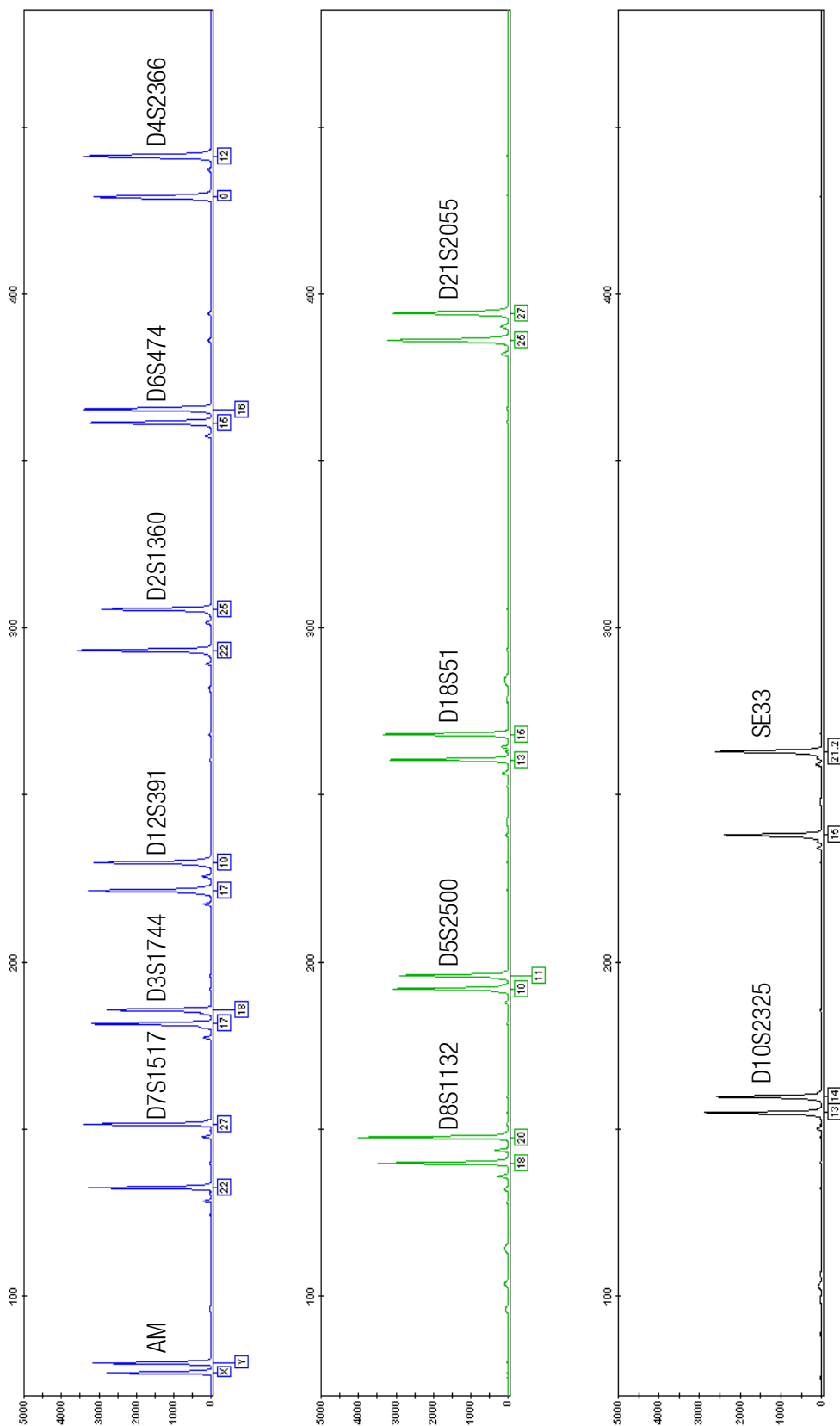
Die in **Tabelle 4** bis **Tabelle 6** angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA Längenstandard 550 (BTO) und die Messung am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer mit POP-4 Polymer. Unterschiedliche Analysegeräte, DNA Längenstandards oder Polymere können zu anderen Fragmentlängen führen. Die Tabellen enthalten Richtwerte für die Erstellung einer entsprechenden Auswertungsvorlage. Eine weitere Feinabstimmung unter Zuhilfenahme der tatsächlich (am eigenen Gerät) gemessenen Fragmentlängen sollte aufgrund gerätespezifischer Abweichungen vorgenommen werden. Es wird empfohlen, stets zusätzlich einen visuellen Abgleich mit der entsprechenden Allelleiter vorzunehmen.

### Skalierung

Horizontal: 70-480 bp

Vertikal: nach Signalintensität der Proben

Abbildung 6



**Abb. 6** Elektropherogramm des Mentype® Chimera® unter Verwendung von 500 pg Kontroll-DNA XY5. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit dem DNA Längenstandard 550 (BTO). Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper™ ID Software und dem Mentype® Chimera® Template File durchgeführt.

Abbildung 7

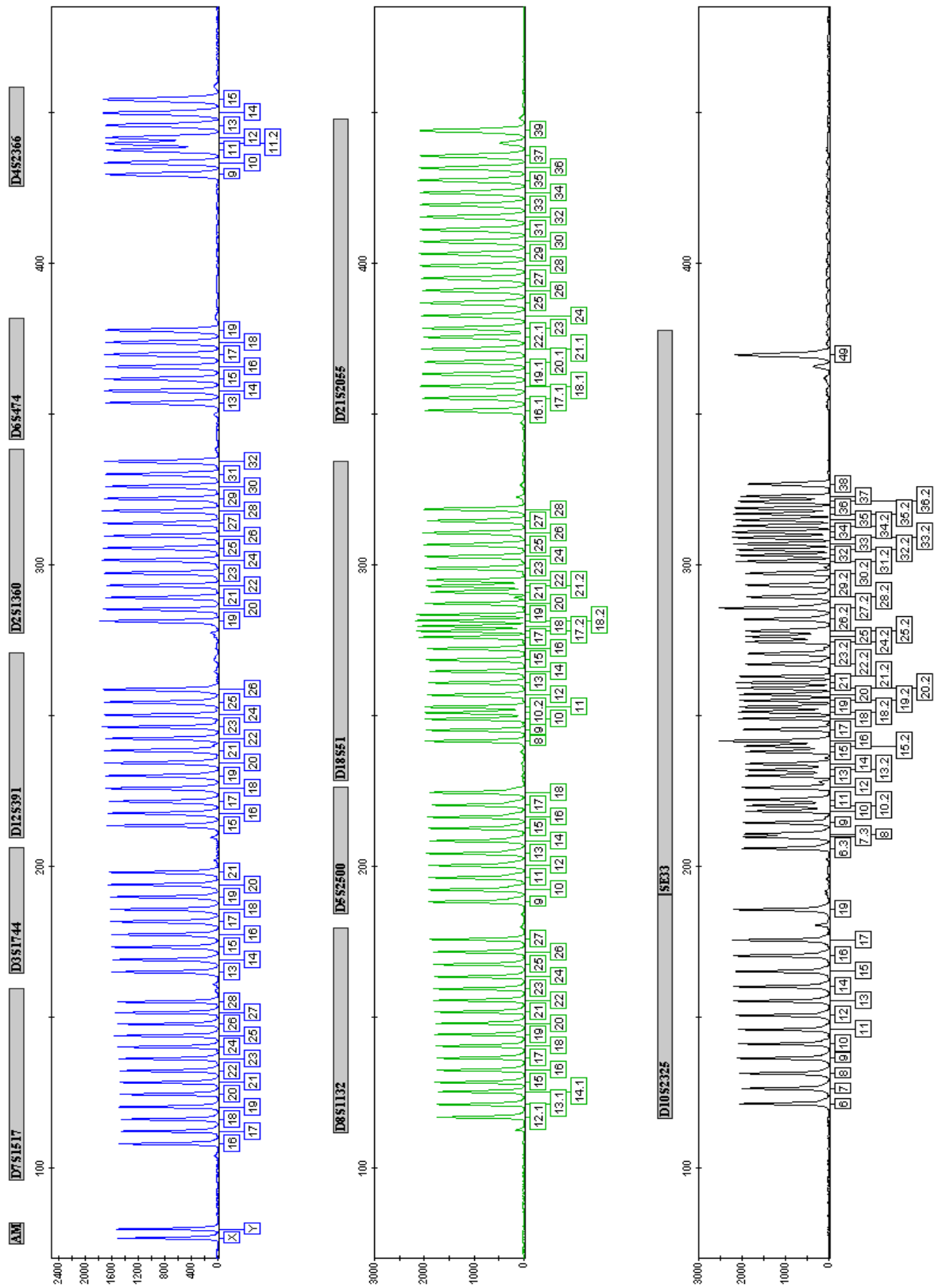


Abb. 7 Elektropherogramm der Allelleiter Mentype® Chimera® analysiert am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper™ ID Software und dem Mentype® Chimera® Template File durchgeführt.

**Tabelle 4. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Chimera® gemessen am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer (blauer Panel)**

Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
<b>Amelogenin</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D12S391</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D6S474</b>	<b>6-FAM</b>	
X	77		15	213		13	354	11, 12
Y	80		16	217	16.3	14	358	
			17	221	17.3	15	362	
			18	226	18.3	16	366	
<b>D7S1517</b>	<b>6-FAM</b>		19	230	19.1, 19.3	17	370	
16	108	14, 15	20	234	20.3	18	374	
17	112		21	238		19	378	
18	116		22	242				
19	120		23	246		<b>D4S2366</b>	<b>6-FAM</b>	
20	124		24	250		9	429	9.2
21	128		25	254		10	433	10.2
22	132		26	258	27	11	437	
23	136					11.2	440	
24	140		<b>D2S1360</b>	<b>6-FAM</b>		12	441	
25	144		19	281		13	445	
26	148		20	285		14	449	
27	152		21	289		15	454	
28	155	29	22	293				
			23	297				
<b>D3S1744</b>	<b>6-FAM</b>		24	302				
13	165		25	306				
14	169		26	310				
15	173		27	314				
16	177		28	318				
17	182		29	322				
18	186		30	326				
19	190		31	330				
20	194		32	334				
21	198	22						

**Tabelle 5. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Chimera® gemessen am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer (grüner Panel)**

Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
<b>D8S1132</b>	<b>BTG</b>		<b>D18S51</b>	<b>BTG</b>		<b>D21S2055</b>	<b>BTG</b>	
12.1	117	12, 13	8	241	7	16.1	351	
13.1	121		9	245	9.2	17.1	355	
14.1	125	14.3	10	249		18.1	359	
15	128		10.2	251		19.1	363	
16	132		11	253	11.2	20.1	367	
17	136		12	257	12.2	21.1	371	
18	140		13	261	13.2	22.1	375	22
19	144		14	264	14.2	23	378	23.1
20	148		15	268		24	382	
21	151		16	272	16.2	25	386	
22	155		17	276		26	390	
23	159		17.2	278	17.3	27	395	
24	163		18	279		28	399	
25	167		18.2	281		29	403	
26	171		19	283	19.2	30	406	
27	175		20	287		31	411	
			21	291		32	415	
			21.2	293		33	419	
<b>D5S2500</b>	<b>BTG</b>		22	295		34	423	
9	188		23	299	23.1	35	427	
10	192		24	302		36	431	
11	196		25	306		37	435	38
12	200		26	310		39	443	
13	204		27	314				
14	208		28	318	29			
15	212							
16	216							
17	220							
18	224							

**Tabelle 6. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Chimera® gemessen am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer (gelber Panel)**

Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
<b>D10S2325</b>	<b>BTY</b>		<b>SE33</b>	<b>BTY</b>		<b>SE33</b>	<b>BTY</b>	
6	121		6.3	205	4.2, 5.3	25.2	278	
7	126		7.3	209	7	26.2	282	26
8	131		8	210	8.2	<b>27.2<sup>‡</sup></b>	<b>285</b>	27
9	136	9.4	9	214	9.2	28.2	289	28, 28.3
10	141		10	218		29.2	293	29
11	145	11.4	10.2	220		30.2	297	30
12	150		11	222	11.2	31.2	301	31
13	155		12	226	12.2	32	303	
14	160		13	230		32.2	305	
15	165		13.2	232	13.3	33	307	
16	170		14	234	14.2, 14.3	33.2	309	
17	175	18	15	238		34	311	
19	185		15.2	240		34.2	313	
			<b>16<sup>‡</sup></b>	<b>241</b>	16.2, 16.3	35	315	
			17	245	17.2, 17.3	35.2	317	
			18	249		36	318	
			18.2	251	18.3	36.2	321	
			19	253		37	322	37.2
			19.2	255		38	326	39,42
			20	257	20.1	49	369	50
			20.2	259				
			21	261				
			21.2	263	22			
			22.2	267				
			23.2	270	23			
			24.2	274	24			
			25	276				

\* gerundet auf ganze Zahlen

\*\* Diese „off-ladder“ Allele des Biotype DNA Pools werden mit den aktuellen Biotype® Template Files für die Genotyper® oder GeneMapper™ ID Software zugeordnet. Für weitere Allele siehe u.a. [http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str\\_fact.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm)

‡ Diese Allele werden zur besseren Orientierung innerhalb der Allelleiter verstärkt dargestellt.

## 7. Interpretation der Ergebnisse

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

Eine automatisierte Berechnung des Spender-DNA-Anteils sowie der Standardabweichung und des Detektionslimits direkt aus den Rohdaten einer Fragmentanalyse wird z. B. mit der GenoProof<sup>®</sup> 2 Software der Qualitytype AG gewährt.

### 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 durch Fehler der Taq DNA Polymerase während der PCR n-4 Peaks, d.h. der Stutterpeak ist 4 Basen kleiner als das wahre Allel. Wiederholungseinheiten werden innerhalb des STR übersprungen. Zur Bewertung der Peaks gelten die Vorgaben der Template Files für die Genotyper<sup>®</sup> und GeneMapper<sup>™</sup> 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<sup>®</sup> Primer sind so gestaltet, dass diese Artefaktbildung minimiert wird. Zusätzlich wird die Bildung des Artefakts durch den abschließenden Extensionsschritt im PCR-Protokoll (68°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.

### Artefakte

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten der PCR-Produkte an Kapillargeräten stark beeinflussen und bei zu geringer Temperatur zum Auftreten von Schultern oder Doppelpeaks (Split Peaks) führen. Sollten diese Effekte beobachtet werden, empfehlen wir eine erneute Injektion der Proben.

## 8. Populationsgenetische Daten

Die wichtigsten populationsgenetischen Daten für jeden STR Marker sind in den folgenden **Tabellen 7-10** angegeben. Die Formel für die Berechnung des „Polymorphism Information Content“ (**PIC**) wurde von Botstein et al. (1980) publiziert, die für die „Expected Heterozygosity“ (**HET**) von Nei und Roychoudhury (1974) sowie die für die Berechnung des „Power of Discrimination“ (**PD**) von Jones (1972). Alle Formeln sind für autosomale Marker geeignet.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n f_i^2 f_j^2$$

$$HET = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{j=1}^K f_j^2 \right)$$

$$PD = 1 - \sum_i f_i^2$$

Mit der GenoProof<sup>®</sup> Software der Qualitytype AG können alle wichtigen populationsgenetischen Daten berechnet werden.

**Tabelle 7. Populationsgenetische Daten**

Marker D2S1360		Marker D3S1744		Marker D4S2366	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
19	0.007	13	0.007	9	0.347
20	0.126	14	0.104	10	0.179
21	0.060	15	0.053	11	0.074
22	0.309	16	0.100	12	0.147
23	0.142	17	0.319	13	0.168
24	0.098	18	0.197	14	0.074
25	0.086	19	0.130	15	0.011
26	0.093	20	0.067		
27	0.035	21	0.023		
28	0.023				
29	0.012	PIC	0.790	PIC	0.760
30	0.002	PD	0.943	PD	0.919
31	0.005	HET	0.792	HET	0.795
32	0.002				
PIC	0.820				
PD	0.955				
HET	0.856				

**Tabelle 8. Populationsgenetische Daten**

Marker D5S2500		Marker D6S474		Marker D7S1517	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
9	0.007	13	0.246	16	0.007
10	0.084	14	0.212	17	0.007
11	0.313	15	0.154	18	0.049
12	0.161	16	0.285	19	0.120
13	0.061	17	0.097	20	0.101
14	0.042	18	0.005	21	0.099
15	0.213			22	0.082
16	0.103	PIC	0.740	23	0.077
17	0.009	PD	0.918	24	0.155
18	0.007	HET	0.733	25	0.230
				26	0.054
PIC	0.780			27	0.014
PD	0.938			28	0.005
HET	0.804				
				PIC	0.860
				PD	0.967
				HET	0.826

**Tabelle 9. Populationsgenetische Daten**

Marker D8S1132		Marker D10S2325		Marker D12S391	
Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz	Allel	Allelfrequenz
16	0.007	6	0.002	15	0.035
17	0.095	7	0.102	16	0.019
18	0.221	8	0.056	17	0.107
19	0.153	9	0.121	17.3	0.019
20	0.128	10	0.142	18	0.215
21	0.119	11	0.144	18.3	0.007
22	0.133	12	0.193	19	0.121
23	0.077	13	0.133	19.3	0.016
24	0.056	14	0.065	20	0.117
25	0.005	15	0.037	21	0.093
26	0.005	16	0.005	22	0.114
27	0.002			23	0.072
		PIC	0.860	24	0.040
PIC	0.850	PD	0.967	25	0.021
PD	0.964	HET	0.851	26	0.002
HET	0.828				
				PIC	0.870
				PD	0.971
				HET	0.893

**Tabelle 10. Populationsgenetische Daten**

<b>Marker D18S51</b>		<b>Marker D21S2055</b>		<b>Marker SE33 (ACTBP2)</b>	
<b>Allel</b>	<b>Allelfrequenz</b>	<b>Allel</b>	<b>Allelfrequenz</b>	<b>Allel</b>	<b>Allelfrequenz</b>
10	0.005	16.1	0.056	11	0.002
12	0.103	17.1	0.021	12	0.014
13	0.110	18.1	0.023	13	0.002
14	0.157	19.1	0.274	13.2	0.002
15	0.199	20.1	0.040	14	0.026
16	0.161	21.1	0.019	15	0.049
17	0.112	22.1	0.005	16	0.047
18	0.072	23	0.007	17	0.070
19	0.028	25	0.112	17.3	0.002
20	0.030	26	0.116	18	0.044
21	0.021	27	0.016	18.3	0.002
24	0.002	28	0.007	19	0.082
		29	0.030	19.2	0.009
PIC	0.850	30	0.021	20	0.044
PD	0.964	31	0.023	20.2	0.009
HET	0.902	32	0.026	21	0.035
		33	0.067	21.2	0.019
		34	0.074	22	0.007
		35	0.053	22.2	0.035
		36	0.007	23.2	0.023
		37	0.002	24	0.002
				24.2	0.035
		PIC	0.870	25.2	0.044
		PD	0.971	26.2	0.040
		HET	0.856	27.2	0.084
				28.2	0.084
				29.2	0.051
				30	0.002
				30.2	0.061
				31.2	0.028
				32.2	0.023
				33	0.009
				33.2	0.005
				34	0.002
				36	0.002
				PIC	0.950
				PD	0.990
				HET	0.949

Alle populationsgenetischen Daten basieren auf einer von der Biotype Diagnostic GmbH durchgeführten Studie an ca. 210 unverwandten Kaukasiern.

## 9. 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 ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.

**Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007)** Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.

**Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980)** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

**Hering S, Müller E (2001)** New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.

**Jones DA (1972)** Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.

**Nei M, Roychoudhury AK (1974)** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.

**Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003)** Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138 37-43.

**Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999)** D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int. J. Legal. Med* 112:360-363.

**Wiegand P, Klintschar M (2002)** Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

## **Notizen**

## **Notizen**

## **Notizen**