

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

## Produktbeschreibung

Das Mentype<sup>®</sup> **DIPplex** PCR Amplification Kit wurde als Multiplex-Anwendung zur Amplifikation von 30 DIPs (Deletion/Insertion Polymorphisms, auch als INDELS bekannt) entwickelt. In einem PCR-Ansatz werden 30 biallelische DIPs sowie Amelogenin (AM) zur Geschlechtsbestimmung simultan amplifiziert. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM**, **BTG**, **BTY** oder **BTR** markiert.

Um die Darstellung des Genotyps zu erleichtern, empfehlen wir die Anwendung der kostenfreien **DIPSorter** Software.

Für forensische Fragestellungen weisen die niedermolekularen DIP-Marker einen beträchtlichen Vorteil bei der Analyse degradierten Spurenmaterials auf, weshalb die maximale Amplikonlänge im Mentype<sup>®</sup> **DIPplex** auf etwa 150 bp beschränkt wurde. Ferner bilden DIPs keine Stutterpeaks, weshalb sie auch für die Mischspurenanalyse von Vorteil sind. Die 30 über 19 Autosomen verteilten DIP-Marker des Mentype<sup>®</sup> **DIPplex** wurden derart ausgewählt, dass sie eine physische Distanz von mindestens 10 Mbp zu kommerziell erhältlichen STR- oder SNP-Markern aufweisen (siehe Tab. 1). Somit verbessern DIPs - in Kombination mit anderen gängigen Standardmarkern - die Ausschlusswahrscheinlichkeit und bieten eine optimale Ergänzung für die Abstammungsbegutachtung.

Die Nachweisgrenze für das Mentype<sup>®</sup> **DIPplex** Testkit liegt bei **100 pg genomischer DNA**. Wir empfehlen den Einsatz von **0.2-0.5 ng DNA**.

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

**Tabelle 1. Ausschlusswahrscheinlichkeiten von DIPs, STRs und SNPs**

	<b>Loci</b>	<b>CPE/Trio *</b>	<b>CPI **</b>	<b>Population</b>
Mentype <sup>®</sup> DIPplex	30 DIPs	0.9980	$2.83 \times 10^{-13}$	German
AmpFISTR Minifiler	8 STRs	0.99976	$8.21 \times 10^{-11}$	US Caucasian
AmpFISTR SEfiler	11 STRs	0.999998	$7.46 \times 10^{-14}$	US Caucasian
Powerplex 16	15 STRs	0.9999994	$5.46 \times 10^{-18}$	US Caucasian
Sanchez et al. 2006	52 SNPs	0.9998	$5.00 \times 10^{-21}$	European

\*combined probability of paternity exclusion, \*\*combined probability of identity

## Inhaltsverzeichnis

1. Beschreibung des Mentype <sup>®</sup> DIPplex.....	3
2. PCR Amplifikation.....	6
2.1 Ansatz des Master Mixes.....	6
2.2 PCR Amplifikationsparameter.....	7
3. Elektrophorese am ABI PRISM <sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer.....	8
3.1 Matrixerstellung.....	8
3.2 Probenvorbereitung.....	11
3.3 Einstellung der GeneScan <sup>®</sup> Software.....	11
3.4 Analyse Parameter.....	12
4. Elektrophorese am ABI PRISM <sup>®</sup> 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer.....	13
4.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung.....	13
4.2 Probenvorbereitung.....	15
4.3 Einstellung der GeneScan <sup>®</sup> Software.....	16
4.4 Analyse Parameter.....	17
5. Elektrophorese am ABI PRISM <sup>®</sup> 3130/3130xl Genetic Analyzer.....	18
5.1 Spektralkalibrierung / Matrixerstellung.....	18
5.2 Probenvorbereitung.....	21
5.3 Einstellung der GeneMapper <sup>™</sup> ID Software.....	22
5.4 Analyse Parameter / Analysis Method DIPplex.....	24
6. Auswertung.....	25
6.1 Biotype <sup>®</sup> Auswertevorlagen.....	26
6.2 Kontrollen.....	27
6.3 Fragmentlängen und Allele.....	28
7. Interpretation der Ergebnisse.....	32
8. Referenzen.....	33

## 1. Beschreibung des Mentype® DIPplex

**Tabelle 2. Locus-spezifische Informationen für Mentype® DIPplex**

DIP Locus	Chromosomale Kartierung	GenBank® Accession / SNP ID	Motiv (+DIP)	Referenz Allel
<b>DIPplex_Blue</b>				
AM X	Xp22.1-22.3	M55418		X
AM Y	Yp11.2	M55419		Y
HLD77	7q31.1	rs1611048	TAAG	+DIP
HLD45	2q31.1	rs2307959	CACG	-DIP
HLD131	7q36.2	rs1611001	TGGGCTTATT	+DIP
HLD70	6q16.1	rs2307652	AGCA	-DIP
HLD6	16q13	rs1610905	GCAGGACTGGGCACC	-DIP
HLD111	17p11.2	rs1305047	CACA	-DIP
HLD58	5q14.1	rs1610937	AGGA	+DIP
HLD56	4q25	rs2308292	TAAGT	+DIP
<b>DIPplex_Green</b>				
HLD118	20p11.1	rs16438	CCCCA	-DIP
HLD92	11q22.2	rs17174476	GTTT	-DIP
HLD93	12q22	rs2307570	ACTTT	-DIP
HLD99	14q23.1	rs2308163	TGAT	-DIP
HLD88	9q22.32	rs8190570	CCACAAAGA	+DIP
HLD101	15q26.1	rs2307433	GTAG	-DIP
HLD67	5q33.2	rs1305056	CTACTGAC	-DIP
<b>DIPplex_Yellow</b>				
HLD83	8p22	rs2308072	AAGG	-DIP
HLD114	17p13.3	rs2307581	TCCTATTCTACTCTGAAT	-DIP
HLD48	2q11.2	rs28369942	GACTT	-DIP
HLD124	22q12.3	rs6481	GTGGA	-DIP
HLD122	21q22.11	rs8178524	GAAGTCTGAGG	-DIP
HLD125	22q11.23	rs16388	ATTGCC	-DIP
HLD64	5q12.3	rs1610935	GACAAA	+DIP
HLD81	7q21.3	rs17879936	GTAAGCATTGT	-DIP
<b>DIPplex_Red</b>				
HLD136	22q13.1	rs16363	TGTTT	-DIP
HLD133	3p22.1	rs2067235	CAACCTGGATT	-DIP
HLD97	13q12.3	rs17238892	AGAGAAAGCTGAAG	-DIP
HLD40	1p32.3	rs2307956	GGGACAGGTGGCCACTAGGAGA	+DIP
HLD128	1q31.3	rs2307924	ATTAAATA	-DIP
HLD39	1p22.1	rs17878444	CCTAAACAAAATGGGAT	-DIP
HLD84	8q24.12	rs3081400	CTTTC	-DIP

Abkürzungen: HLD = Human Locus DIP, -DIP = Deletions Polymorphismus, +DIP = Insertions Polymorphismus

Tabelle 2 zeigt die DIP-Loci des Mentype® **DIPplex** mit ihren chromosomalen Kartierungen, den GenBank® / SNP ID Nummern und Motiven sowie Referenzallelen.

## Inhalt

### Mentype® **DIPplex** 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	500 µL
DNA Polymerase / DNA polymerase	60 µL
Kontroll-DNA XY5 / Control DNA XY5 (2 ng/µL)	10 µL
DNA Längenstandard 550 / DNA Size Standard 550 (BTO)	50 µL
Allelleiter / Allelic ladder	25 µL

## Bestellinformation

Mentype® <b>DIPplex</b>	25	Reaktionen	Artikelnummer	45-31110-0025
Mentype® <b>DIPplex</b>	100	Reaktionen	Artikelnummer	45-31110-0100
Mentype® <b>DIPplex</b>	400	Reaktionen	Artikelnummer	45-31110-0400

## 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® Testkit enthaltenen Bestandteilen folgende Reagenzien:

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Hi-Di™ 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 PCR Amplifikation Kit enthalten:

<b>Kitbestandteil</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Gefahr</b>
Primergemisch, 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> ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype Diagnostic GmbH.

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 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	13.4 µL
Reaktionsgemisch <b>A*</b>	5.0 µL
Primergemisch	5.0 µL
Taq DNA Polymerase (hot start, 2.5 U/µL)	0.6 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 Spurenproben können 5 µL notwendig sein. Eine weitere 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 bei **30 PCR-Zyklen** mit **0.2 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 0.2 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 Taq 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 Spurenmaterial (< 100 pg DNA) wird eine Erhöhung der Zyklenzahl von 30 auf 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>
61°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	
10°C	∞	bis zum Ende

### Optional

empfohlen für Spurenproben mit geringen 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>
61°C	120 s	
72°C	75 s	
68°C	60 min	
10°C	∞	bis zum Ende

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® und 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 und Proben bezeichnen

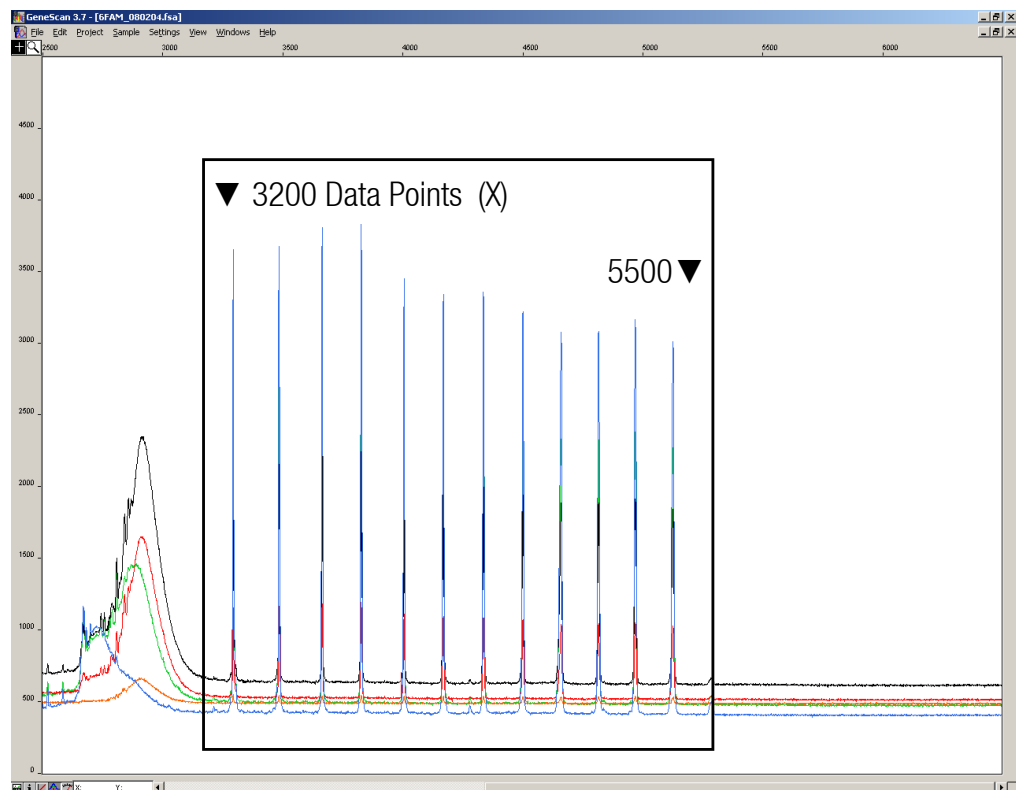
## Injektionsliste für die Matrixerstellung

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** 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)

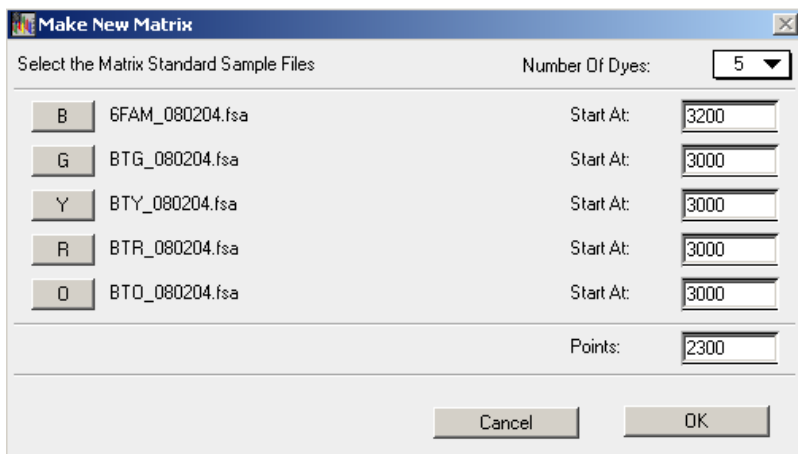


**Abb. 1** Elektropherogramm der Rohdaten des Matrix Standards 6-FAM

- 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_60-200bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15.0
Run [kV]	15.0
Run [°C]	60
Run Time [min]**	<b>20</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, 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 Mentype® **DIPplex** angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **200 bp** analysiert werden können.

### 3.4 Analyse Parameter

Die empfohlenen Analyse Parameter sind:

Analysis Range	Start: 2000 Stop: 6000
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<sup>®</sup> 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.

#### 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® ABI 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 in der **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
- Sollte die Kalibrierung nicht erfolgreich sein, 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 der Spannung (**Injection Voltage**) auf 3 kV und der Injektionszeit (**Injection Time**) auf 10 s

#### Run Modul 3kV\_10s\_260bp

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>15</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 Spurenproben können bis zu 20 s notwendig sein.

\*\* Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Mentype® **DIPplex** angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **200 bp** analysiert werden können.

- Auf **Save As** klicken, den Namen des neuen Moduls eingeben (z.B. 3kV\_10s\_260bp) 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	Type name for the samples
Dyes	0
Colour Info	Ladder or Sample
Project Name	z.B. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module*	3kV_10s_260bp
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: 2200 Stop: 6000
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 Analyzelabor festgelegt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte mindestens 3x so hoch sein wie das umgebende Grundrauschen der Basislinie.

## 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

Parameter	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

GA Instruments > ga3130 > 3130-1 > Spectral Viewer

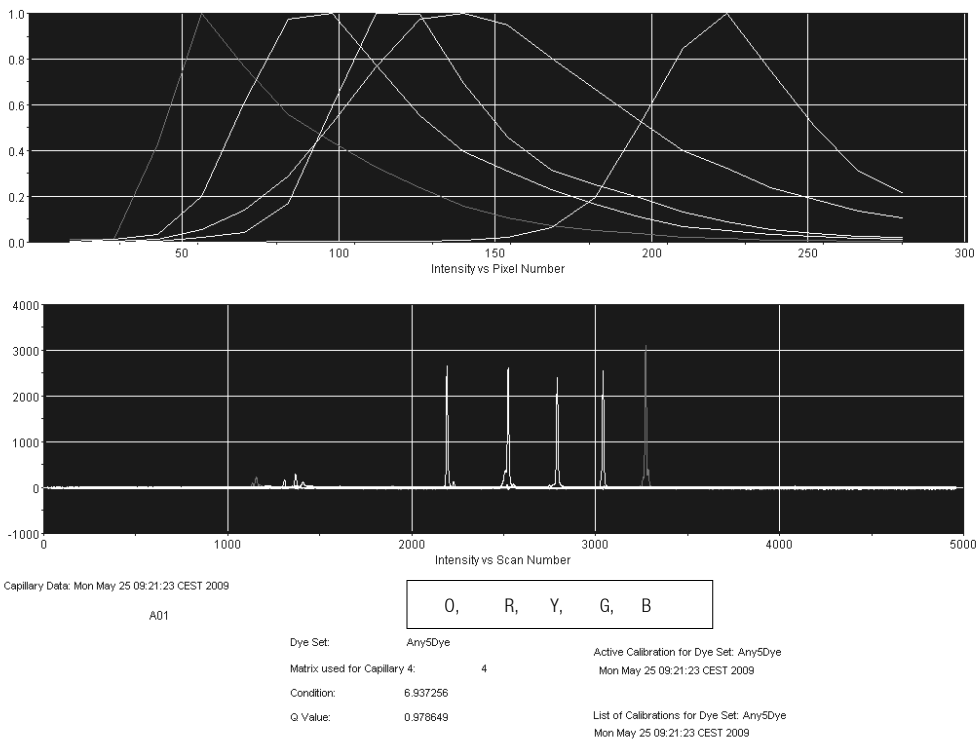


Abb. 4 Elektropherogramm der Spektralkalibrierung mit Matrix Standards BT5 am ABI 3130

## 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 Spektralkalibrierung mit optimierten Werten notwendig

- Haben alle Kapillaren die Kalibrierung erfolgreich durchlaufen, wird die Kalibrierungsdatei für **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\_260bp

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>900</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 Spurenproben können bis zu 20 s notwendig sein.

\*\* Abhängig von den Analysebedingungen ist die Run Time für Mentype® **DIPplex** angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **200 bp** analysiert werden können.

- Auf **Save As** klicken, den Namen des neuen Moduls eingeben (z.B. 3kV\_10s\_260bp) 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	Run36_POP4_BT5_15min
Type	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_260bp
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_60-260bp
Panel	z.B. DIPplex_Panels_v0
Analysis Method	z.B. DIPplex_HID_3130_200rfu
SnP Set	-
User-defined 1-3	-
Results Group 1	(Results Group auswählen)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_15min (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** wählen, 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 DIPplex

Die empfohlenen Einstellungen im **Tabellenblatt Peak Detector** sind:

Peak Detection Algorithm	Advanced
Ranges	Analysis: Partial Range Start Pt: 2200; Stop Pt: 6000 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

Die empfohlenen Einstellungen im **Tabellenblatt Allele** sind:

Amelogenin Cutoff\*\* 0.1

Die empfohlenen Einstellungen im **Tabellenblatt Peak Quality** sind:

Heterozygote balance	Min peak height ratio: 0.1
Allele number	Max expected alleles: 20

\* 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.

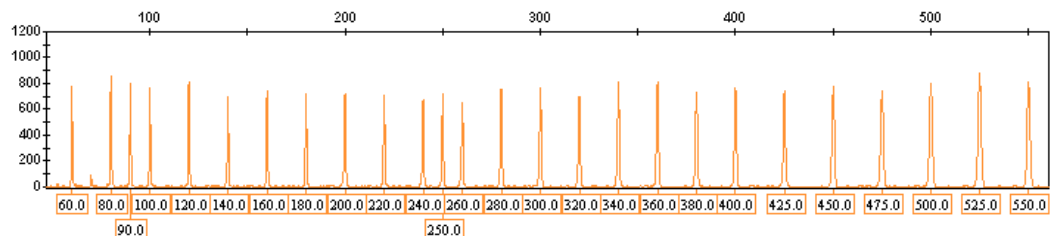
\*\* Alle DIPs werden von der GeneMapper™ ID Software wie Amelogenin behandelt.

## 6. Auswertung

Allgemeine Anweisungen zur automatischen Auswertung können der entsprechenden Anleitung *GeneScan*<sup>®</sup> oder *GeneMapper*<sup>™</sup> *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 DIP-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

Mentype<sup>®</sup> **DIPplex**: Die Grundvorlage des DNA-Längenstandards 550 (BTO) für die *GeneMapper*<sup>™</sup> *ID Software* wurde für 60-260 bp erstellt. Eine eigene neu erstellte Vorlage kann unter dem Namen SST-BTO\_60-260bp gespeichert und für weitere Analysen 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> **DIPplex** 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.

Um die Darstellung des Genotyps zu erleichtern, stellen wir die kostenfreie Software **DIPSorter** zur Verfügung. Für die Nutzung der **DIPSorter** Software achten Sie bitte auf die Verwendung der empfohlenen **Table Settings** für die Darstellung und den Export der Genotyp Tabellen aus der GeneMapper™ ID (Table for 20 Alleles) oder Genotyper<sup>®</sup> Software (Vertical Table for 20 Alleles).

Sample Name	Marker	Dye	Allele 1	Allele 2	...	Allele 20	...
-------------	--------	-----	----------	----------	-----	-----------	-----

Export Table from GeneMapper™ ID software

File Name	Sample Info	Category	Peak 1	Peak 2	...	Peak 20
-----------	-------------	----------	--------	--------	-----	---------

Export Table from Genotyper<sup>®</sup> software

Empfohlene Biotype<sup>®</sup> Vorlagen für GeneMapper™ ID Software sind:

Panels	DIPplex_Panels_v0	oder höhere Version
BinSets	DIPplex_Bins_v0	oder höhere Version
Size Standard	SST-BTO_60-260bp	
Analysis Method	DIPplex_HID_310_50rfu	
	DIPplex_HID_310_200rfu	
	DIPplex_HID_3130_50rfu	
	DIPplex_HID_3130_200rfu	
Plot Settings	Plots_5dyes	
Table Settings	Table for 20 Alleles	

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

DIPplex\_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 Testkit enthaltene Kontroll-DNA XY5 sowie kommerziell erhältliche DNAs repräsentieren folgende Allele:

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

Locus	Kontroll-DNA XY5	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
AM	X/Y	X	X	X/Y	X/Y
HLD77	+	-/+	-	+	+
HLD45	-	-	-/+	+	-/+
HLD131	-/+	-/+	-	-/+	+
HLD70	-	-/+	+	-/+	-
HLD6	-/+	+	+	-/+	-/+
HLD111	-	+	-/+	-/+	-/+
HLD58	-/+	-	+	+	+
HLD56	-	-	-/+	-	-/+
HLD118	-/+	-	-	-	-/+
HLD92	+	+	-/+	+	-
HLD93	-/+	+	-	-	-/+
HLD99	-/+	+	-/+	+	-/+
HLD88	-/+	-	-	-/+	+
HLD101	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
HLD67	+	-/+	+	+	+
HLD83	-/+	-	-/+	-	-
HLD114	-	-	-	+	-/+
HLD48	-/+	+	+	-/+	+
HLD124	-/+	-	-/+	+	+
HLD122	-	-	-/+	-	-/+
HLD125	-	-	-/+	+	-
HLD64	-/+	-	+	-/+	-/+
HLD81	-/+	-/+	-	-/+	+
HLD136	-/+	+	-/+	+	-/+
HLD133	-/+	-	+	+	-/+
HLD97	-/+	-	-/+	-/+	+
HLD40	-/+	+	-	-/+	+
HLD128	-	-/+	-/+	-	-/+
HLD39	-/+	-/+	-	+	-
HLD84	-	+	-	-/+	-

Die Referenz-DNA K-562 ist bei ATCC zu beziehen (<http://www.atcc.org/Products/PurifiedDNA.cfm#celllines>). Die Referenz-DNA 9947A, 9948 und 3657 sind bei Coriell Cell Repositories erhältlich (CCR; <http://locus.umdj.edu/nigms>). Damit wird den Anforderungen von Szibor et al. (2003) entsprochen.

### **6.3 Fragmentlängen und Allele**

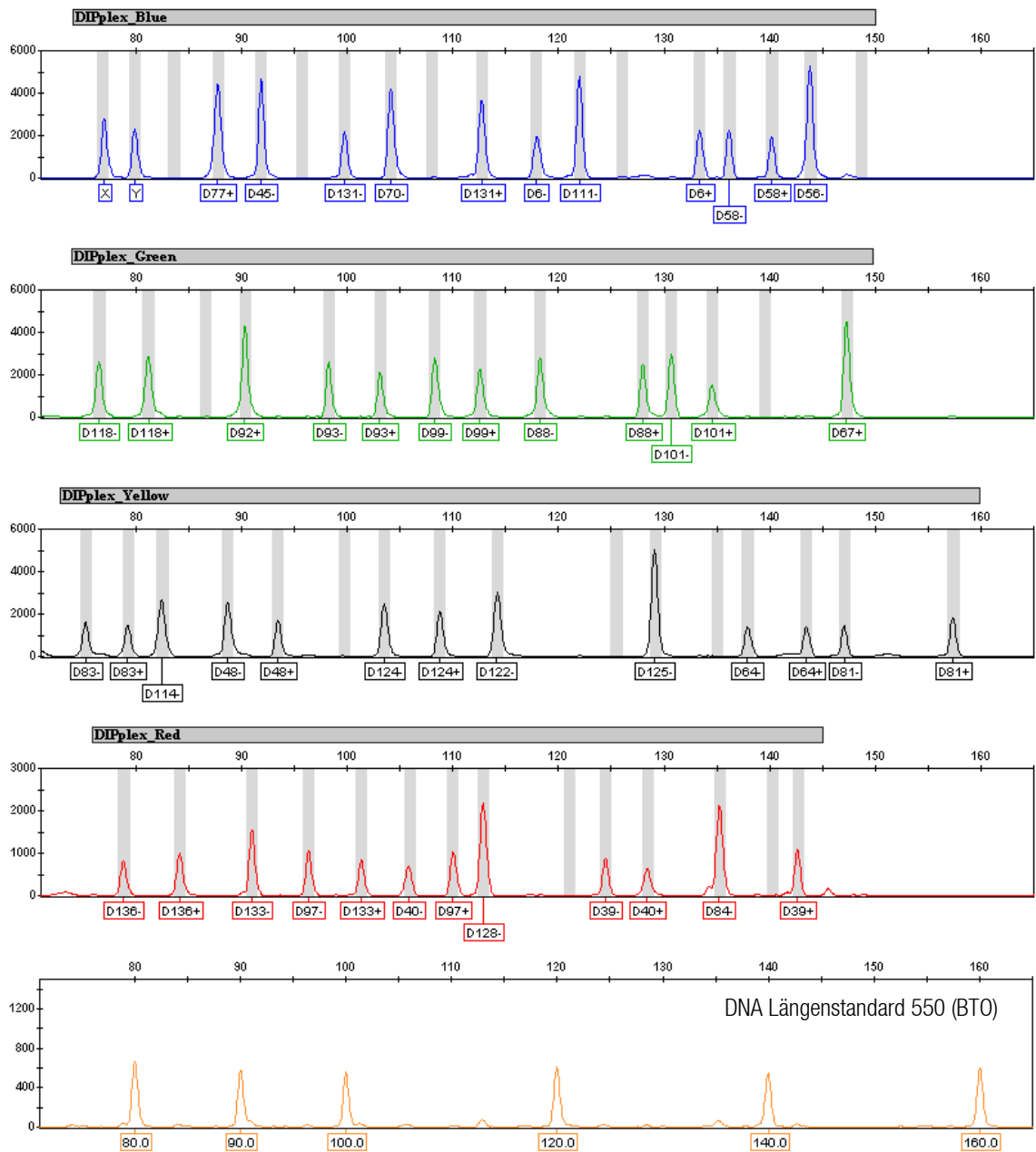
Die in **Tabelle 4** bis **Tabelle 5** angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA Längenstandard 550 (BTO) und die Messung am ABI PRISM<sup>®</sup> 310/3130 Genetic Analyzer mit POP-4 Polymer. Unterschiedliche Analysegeräte, DNA Längenstandards oder Polymere können zu anderen Fragmentlängen führen. Es wird empfohlen, bei jedem Lauf einen visuellen Abgleich mit der entsprechenden Allelleiter vorzunehmen.

#### **Skalierung**

Horizontal: 70-205 bp

Vertikal: nach Signalintensität der Proben

Abbildung 6



**Abb. 6** Elektropherogramm des Mentype® **DIPplex** unter Verwendung von 200 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® **DIPplex** Template File durchgeführt.

Abbildung 7

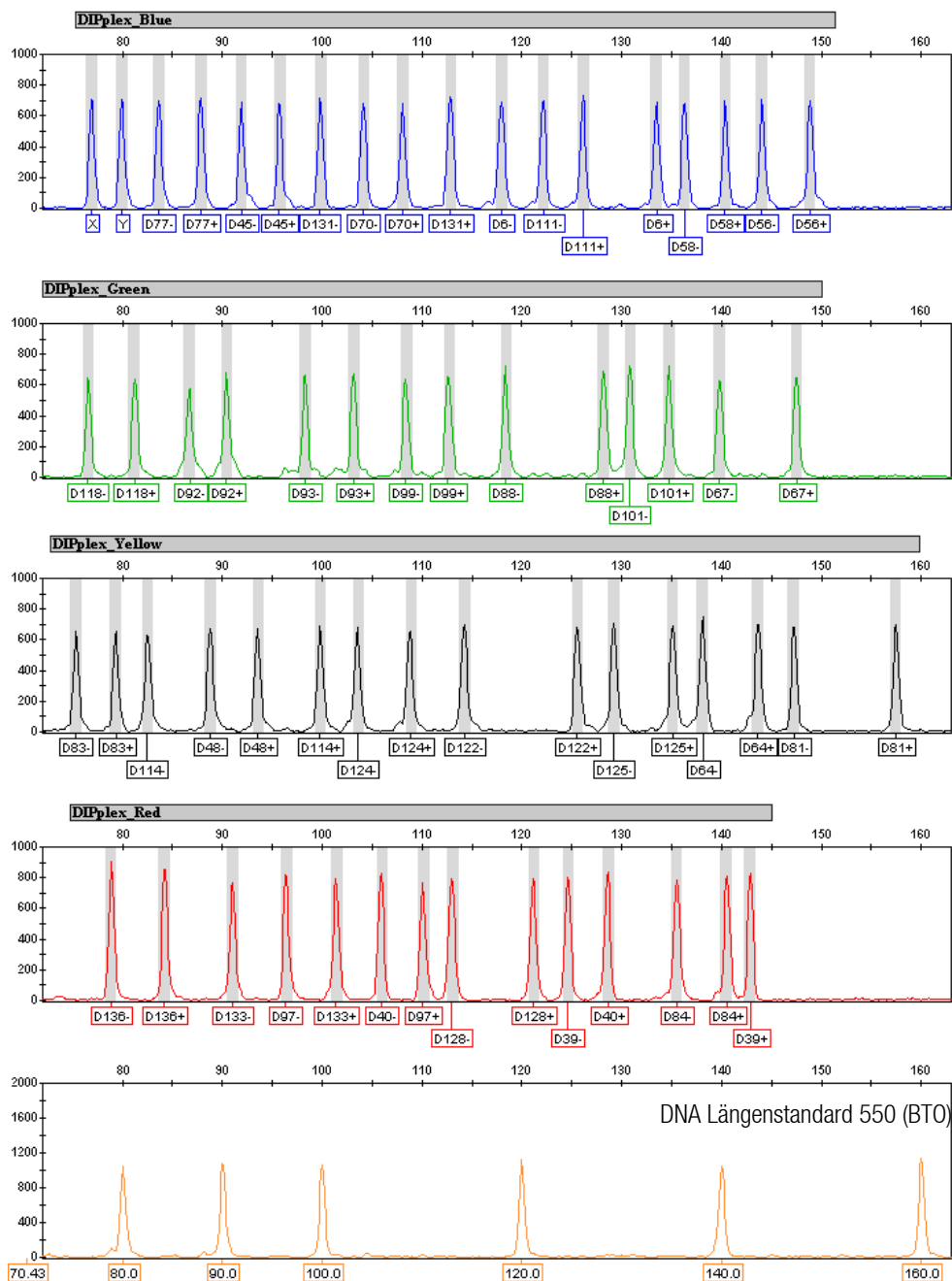


Abb. 7 Elektropherogramm der Allelleiter Mentype® DIPplex. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer mit dem DNA Längenstandard 550 (BTO). Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper™ ID Software und dem Mentype® DIPplex Template File durchgeführt.

**Tabelle 4. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype<sup>®</sup> DIPplex gemessen am ABI PRISM<sup>®</sup> 310/3130 Genetic Analyzer (blauer und grüner Panel)**

Marker/Blue	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marker/Green	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
AM	77 (X)	80 (Y)	HLD118	77	81
HLD77	84	88	HLD92	87	90
HLD45	92	96	HLD93	98	103
HLD131	100	113	HLD99	108	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD6	118	133	HLD101	131	135
HLD111	122	126	HLD67	140	147
HLD58	136	140			
HLD56	144	149			

**Tabelle 5. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype<sup>®</sup> DIPplex gemessen am ABI PRISM<sup>®</sup> 310/3130 Genetic Analyzer (gelber und roter Panel)**

Marker/Yellow	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marker/Red	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
HLD83	75	79	HLD136	79	84
HLD114	83	100	HLD133	91	102
HLD48	89	94	HLD97	96	110
HLD124	104	109	HLD40	106	129
HLD122	115	126	HLD128	113	121
HLD125	129	135	HLD39	125	143
HLD64	138	144	HLD84	135	140
HLD81	147	158			

\* gerundet auf ganze Zahlen

## 7. 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)

Bei STR-Motiven hängt das Auftreten von Stotterbanden von der Sequenz und Anzahl der Wiederholungseinheiten ab. Im Vergleich dazu entstehen bei DIP Motiven **keine** Stotterbanden. Die Peak-Zuordnung von DNA-Mischungen wird wesentlich erleichtert. Zur Bewertung der Peaks gelten die Vorgaben der Template Files für die Genotyper<sup>®</sup> 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<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 Doppelpicks (Split Peaks) führen. Aufgrund ihrer Sequenz reagieren insbesondere die Loci HLD77, HLD118, HLD92, HLD114, HLD136 und HLD40 verstärkt auf zu niedrige Umgebungstemperaturen während der Analyse. Sollten diese Effekte beobachtet werden, empfehlen wir eine erneute Injektion der Proben.

Außerhalb des Allelbereichs (>170 bp) können vereinzelt Amplifikationsartefakte mit sehr geringen Signalhöhen auftreten.

## 8. 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.

**Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr, WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS (2006)** DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int.* Jul 13;160 (2-3):90-101.

**Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE (2006)** An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16 (9):1182-1190, 2006.

**Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N (2006)** A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis.* 2006 May;27(9):1713-24.

**Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G (2002)** Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet* 71(4):854-862.

## **Notizen**

## **Notizen**

## **Notizen**