



# Mentype<sup>®</sup> Nonaplex<sup>QS</sup>

PCR Amplification Kit

## Gebrauchsanweisung

Das Mentype<sup>®</sup> Nonaplex<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit ist eine Multiplex-Anwendung für die in der deutschen forensischen DNA-Analyse-Datei (DAD) zu erfassenden Short Tandem Repeat (STR) Loci. In einem PCR-Ansatz werden die acht polymorphen STR-Loci **D3S1358**, **D8S1179**, **D18S51**, **D21S11**, **FGA (FIBRA)**, **SE33 (ACTBP2)**, **TH01 (TC11)** und **vWA** sowie der Geschlechtsmarker **Amelogenin** simultan amplifiziert.



100, 400



20. Januar 2020



41-09330-0100  
41-09330-0400



Biotype GmbH  
Moritzburger Weg 67  
D-01109 Dresden  
Germany

Made in Germany

Die Biotype GmbH entwickelt, produziert und vertreibt PCR-basierte Anwendungen für die medizinische Diagnostik.

Für Informationen und Anregungen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.  
Kontaktieren Sie uns oder besuchen Sie unsere Website.

Tel.: +49 351 8838 400 (Mo. – Fr., 9 – 17 Uhr)

E-Mail: [support@biotype.de](mailto:support@biotype.de)  
[www.biotype.de](http://www.biotype.de)

Unsere Mentype® Test Kits garantieren höchste Qualitätsstandards für  
Klinik und Forschung.

## Warenzeichen und Patente

Mentype® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype GmbH.  
 ABI PRISM®, GeneAmp®, GeneScan®, Genotyper® GeneMapper™ und Applied Biosystems sind eingetragene Warenzeichen der Thermo Fisher Scientific Inc..  
 6-FAM, HEX, NED, ROX, POP-4 und Hi-Di sind Warenzeichen der Thermo Fisher Scientific Inc..  
 GenBank® ist ein eingetragenes Warenzeichen vom National Institute of Health.

### NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product is sold under licensing arrangements between Licensee and Life Technologies Corporation. The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under certain U.S. and foreign patent(s) owned by Life Technologies Corporation to use only this amount of the product to practice the claims in said patents solely for activities of the purchaser in the field of human or animal identification. No other rights are conveyed. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008. Email: outlicensing@lifetech.com.

## Warnungen und Sicherheitshinweise

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem PCR Amplifikation Kit enthalten:

<b>Kitbestandteil</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Gefahr</b>
Reaktionsgemisch	Natriumazid NaN <sub>3</sub>	giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

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

© Biotype GmbH, alle Rechte vorbehalten

**Inhaltsverzeichnis**

1. Produktbeschreibung.....	5
2. PCR Amplifikation.....	8
3. Elektrophorese am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer .....	10
4. Elektrophorese am ABI PRISM® 3130/3130xl Genetic Analyzer.....	15
5. Auswertung .....	22
6. Biotype® Auswertevorlagen.....	23
7. Kontrollen .....	24
8. Interpretation der Ergebnisse.....	34
9. Referenzen .....	35

## 1. Produktbeschreibung

Das Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</sup> PCR Amplification Kit ist eine Multiplex-Anwendung für die in der deutschen forensischen DNA-Analyse-Datei (DAD) zu erfassenden Short Tandem Repeat (STR) Loci. In einem PCR-Ansatz werden die acht polymorphen STR-Loci **D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (ACTBP2), TH01 (TC11)** und **vWA** sowie der Geschlechtsmarker **Amelogenin** simultan amplifiziert.

Das Testkit wurde speziell für die schnelle und zuverlässige Erstellung von DNA-Befunden aus Blutproben bzw. Abstrichen der Wangenschleimhaut von Vergleichspersonen sowie aus Spuren entwickelt. Darüber hinaus verfügt das Kit über ein Primerset, dass alle bekannten Mutationen in der Primerbindungsstelle des SE33 Locus kompensiert. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM** (Amelogenin, D8S1179, D21S11 und D18S51), **HEX** (TH01, D3S1358 und SE33) oder **NED** (vWA und FGA) markiert.

Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</sup> wurde mit einer **internen PCR-Kontrolle** ausgestattet (Quality Sensor "QS"), die hilfreiche Informationen über die Effizienz der PCR sowie über mögliche PCR-Inhibitoren liefert.

Die Nachweisgrenze für das Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</sup> Testkit liegt bei weniger als **100 pg genomischer DNA**. Wir empfehlen den Einsatz von **0.2-1.0 ng DNA**.

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

**Tabelle 1. Locus-spezifische Informationen für Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup>**

Locus	GenBank® Accession	Repeatmotiv des Referenz Alleles	Referenz Allel	Allel- Bereich
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>	18	8-26
D8S1179	G08710	[TCTA] <sub>12</sub>	12	6-21.2
D18S51	L18333	[AGAA] <sub>13</sub>	13	5.3-42
D21S11	AP000433	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA [TCTA] <sub>3</sub>	29	12-46
FGA (FIBRA)	M64982	TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub> [TTTC] <sub>3</sub> TTTTCTCT [CTTT] <sub>13</sub> CTCC [TTCC] <sub>2</sub>	21	12.2-51.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>	25.2	3-50
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] <sub>9</sub>	9	3-14
vWA	M25858	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>	18	10-26

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). 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® Nonaplex<sup>QS</sup>**

Locus	Chromosomale Kartierung
Amelogenin X	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	Yp11.2
D3S1358	3p25.3
D8S1179	8q23.1-23.2
D18S51	18q21.3
D21S11	21q21.1
FGA (FIBRA)	4q28.2
SE33	6q14.2
TH01	11p15.5pter
vWA	12p13.31

## Inhalt

Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</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 XY1 / Control DNA XY1 (2 ng/µL)	10 µL
DNA Längenstandard 550 / DNA Size Standard 550 (ROX)	50 µL
Allelleiter / Allelic ladder*	10 µL

\* Zusätzlich zum Testkit kann die erweiterte Allelleiter Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</sup> **extended** (Art. Nr. 48-09330-0010) erworben werden (siehe S. 27 ff).

**Bestellinformation**

Mentype® <b>Nonaplex</b> <sup>QS</sup>	100	Reaktionen	Artikelnummer	41-09330-0100
Mentype® <b>Nonaplex</b> <sup>QS</sup>	400	Reaktionen	Artikelnummer	41-09330-0400

**Lagerung**

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

**Qualitätssicherung**

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

**Zusätzliche Reagenzien**

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

<b>Reagenz</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Bestellnummer</b>
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific Inc.	4311320
Matrix Standards DS-30 für ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc.	401546 und 402996 (NED)
Matrix Standards DS-30 für ABI PRISM® multi-capillary instruments	Thermo Fisher Scientific Inc.	4345827

## 2. PCR Amplifikation

### 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
Taq 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 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 **0,35 ng Kontroll-DNA XY1** 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 XY1 auf 0,35 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.

### 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) werden optional 34 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 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>34 Zyklen</b>
60°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 vier Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, HEX, NED** und **ROX** (auch DS-30 genannt) ist von Applied Biosystems die Nutzung des virtuellen **Filter Sets D** vorgesehen. Grundsätzlich jedoch sind die Filter Sets A und F ebenfalls geeignet.

#### Material

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

#### Matrixerstellung

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

Farbe	Matrix Standard	Bestellnummer
Blau (B)	6-FAM	Life Technologies GmbH, 4345827
Grün (G)	HEX	Life Technologies GmbH, 4345827
Gelb (Y)	NED	Life Technologies GmbH, 4345827
Rot (R)	ROX	Life Technologies GmbH, 4345827

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

Matrix Probe	Komponente	Volumen
Matrix Probe 1	Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
	Matrix Standard <b>6-FAM</b>	1,0 µL
Matrix Probe 2	Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
	Matrix Standard <b>HEX</b>	1,0 µL
Matrix Probe 3	Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
	Matrix Standard <b>NED</b>	1,0 µL
Matrix Probe 4	Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
	Matrix Standard <b>ROX</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

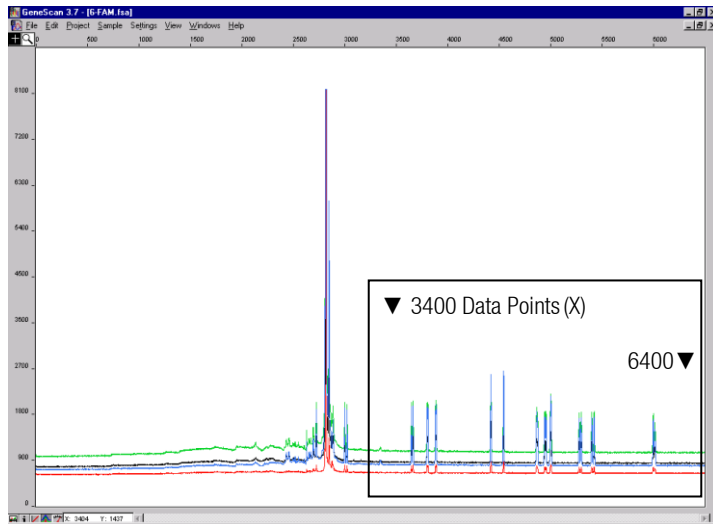
#### Injektionsliste für die Matrixerstellung

Parameter	Einstellung
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) <b>D</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 (ROX)** 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 3400, Endwert 6400
- Differenzwert berechnen, z.B.  $6400 - 3400 = 3000$  Data Points

## Neue Matrix erstellen

- **File** → **New** → **Matrix**

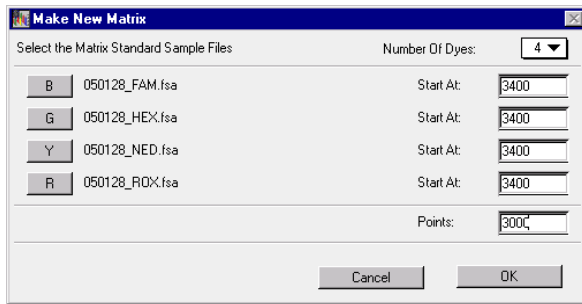


Abb. 2 Matrix Proben auswählen

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

		Reactions			
		B	G	Y	R
B		1.0000	0.4164	0.0415	0.0012
G		0.8472	1.0000	0.6863	0.0107
Y		0.4609	0.4886	1.0000	0.0456
R		0.1273	0.1792	0.4964	1.0000

Abb. 3 Neue Matrix DS-30

- Speichern im Matrix Ordner: **File** → **Save As**, z.B. Matrix DS-30

## 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) auftreten.

## Probenvorbereitung

Komponente	Volumen
Hi-D™ Formamide	12,0 µL
DNA Längenstandard 550 (ROX)	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 (ROX) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Analyse

## Einstellung der GeneScan® Software

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

## Injektionsliste

Parameter	Einstellung
Module File	GS STR POP-4 (1 mL) D

Matrix File	z.B. Matrix DS-30
Size Standard	z.B. SST-ROX_50-450bp
Injection [s]*	5
Injection [kV]	15,0
Run [kV]	15,0
Run [°C]	60
Run Time [min]**	<b>26</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® **Nonaplex**<sup>DS</sup> angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **450 bp** analysiert werden können.

## Analyse-Parameter

Die empfohlenen Analyse Parameter sind:

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

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

\*\* Gelegentlich können Punkttallele, 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® 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 (zuvor ABI 3100-Avant), das 16-Kapillarsystem ABI 3130xl (zuvor ABI 3100).

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

##### Material

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

#### Spektralkalibrierung / Matrixerstellung

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

Die Spektralkalibrierung gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

- 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	47,5 µL
Matrix Standard DS-30	2,5 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte geben, 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	190,0 µL
Matrix Standard DS-30	10,0 µL

- 12 µL des Gemisches in 96-Lochplatte geben, 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_DS30)
Type	SPECTRAL
Dye Set	D
Polymer*	User (z.B. POP4)
Array Length*	User (z.B. 36cm)
Chemistry	Matrix Standard
Run Module*	User (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_DS-30_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_DS30 (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 Schaltfläche **link** wählen, um die 96-Lochplatte auf dem Autosampler mit der soeben erstellten Plattenbezeichnung zu verknüpfen (Position A oder B). Anschließend den Lauf starten.

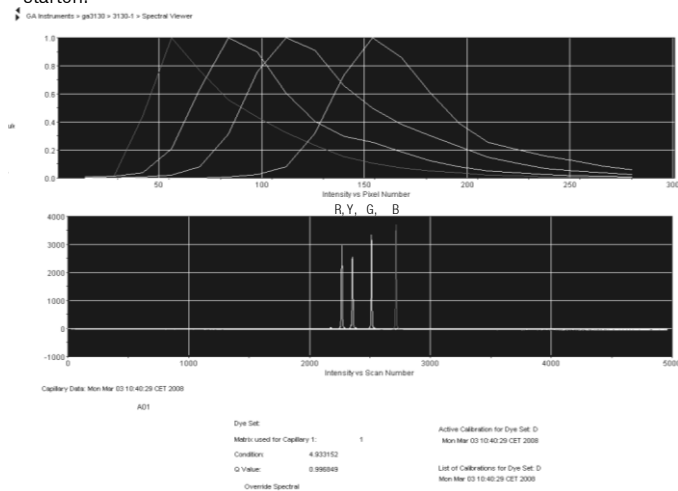


Abb. 4 Elektropherogramm der Spektralkalibrierung mit Matrix Standards DS-30 am ABI 3130

### 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 vier 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) 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 **DyeSetD** im **Spectral Viewer** automatisch aktiv gesetzt. Eine Umbenennung ist über **Rename** möglich (z.B. DS-30\_Datum der Kalibrierung).

### Probenvorbereitung

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	12,0 µL
DNA Längenstandard 550 (ROX)	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 Allelleiter mitlaufen.

Die Raumtemperatur kann das Laufverhalten der PCR-Produkte an Mehrkapillargeräten stark beeinflussen und bei zu geringer Temperatur zum Auftreten von Doppelpicks (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 (ROX) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Analyse

## 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 Module 3kV\_10s\_450bp

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>1320</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® Nonaplex<sup>DS</sup> angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **450 bp** analysiert werden können.

- Auf **Save As** klicken, den Namen des neuen Moduls eingeben (z.B. 3kV\_10s\_450bp) 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_DS-30_22min
Type	REGULAR
Run Module*	3kV_10s_450bp
Dye Set	D

\* Parameter siehe oben

- **OK** wählen, um den Protokollreditor 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™ Platteneditor (I)

New Plate Dialog	Einstellung
Name	z.B. Plate_DS-30_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 Platteneditor.

### GeneMapper™ Platteneditor (II)

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Probe
Priority	z.B. 100 (Voreinstellung)
Sample Type	Probe oder Allelleiter
Size Standard	z.B. SST-ROX_50-450bp
Panel	z.B. Biotype_Panels_v3a (Testkit auswählen)
Analysis Method	z.B. Analysis_HID_3130
Snp Set	-
User-defined 1-3	-
Results Group 1	(Results Group auswählen)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_DS-30 (Einstellung zuvor beschreiben)

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

### Analyse Parameter / Analysis Method

Die empfohlenen Einstellungen im Tabellenblatt Peak Detector sind:

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

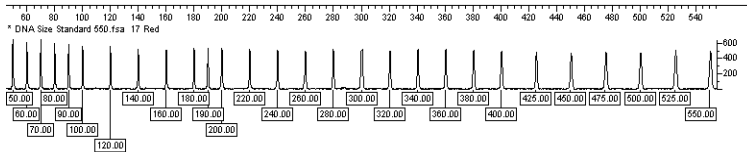
\* Der Grenzwert der Peakamplituden (threshold) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneMapper™ ID Software als einen Peak erkennt. Übliche Werte sind 50-200 RFU und sollten individuell vom Analyzelabor festgelegt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte mindestens 3x so hoch sein wie das Grundrauschen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

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

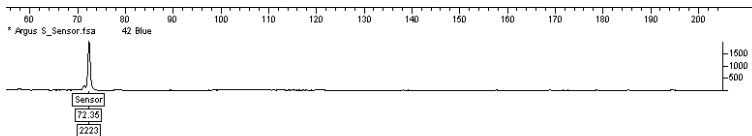
Die Ermittlung der genauen Fragmentlängen der amplifizierten Produkte ist abhängig vom Gerätetyp, von den Elektrophoresebedingungen sowie von dem verwendeten DNA Längenstandard. Aufgrund der Komplexität einiger STR-Loci sollten möglichst viele, gleichmäßig verteilte Referenzpunkte zur Längenbestimmung herangezogen werden. Hierzu verwenden Sie den DNA Längenstandard 550 (ROX) mit den Fragmentlängen **50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525** und **550 bp**.



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

**Anmerkung:** Die Grundvorlage des DNA-Längenstandards 550 (ROX) für GeneMapper™ ID Software muss für den Mentype® **Nonaplex<sup>QS</sup>** auf 450 bp angepasst werden. Die neue Vorlage kann unter dem Namen SST-ROX\_50-450bp gespeichert und für weitere Analysen verwendet werden.

Wie bereits erwähnt ist das Mentype® **Nonaplex<sup>QS</sup>** Testkit mit einer **internen PCR-Kontrolle** ausgestattet, die hilfreiche Informationen über die Effizienz der PCR sowie über die Anwesenheit von PCR Inhibitoren gibt. Unabhängig von der eingesetzten DNA, stellt sich der Qualitätssensor als 6-FAM markiertes PCR-Fragment bei **72 bp** dar. Ein PCR-Kontrollassay ohne DNA enthält nur dieses Fragment und zeigt die erfolgreiche Polymerase-Kettenreaktion an (Abb. 6).



**Abb. 6** Elektropherogramm des PCR-Kontrollassays mit dem 6-FAM-markierten Fragment des Qualitätssensors, Fragmentlänge in bp, Signalintensitäten als Peakhöhe

## 6. Biotype® Auswertevorlagen

Die Allelzuordnungen der aufgetrennten PCR-Produkte (Genotyping) kann mit Hilfe geeigneter Auswertungssoftware erfolgen, z.B. mit GeneMapper™ ID oder Genotyper® Software in Kombination mit Mentype® **Nonaplex**<sup>QS</sup> Auswertevorlagen der Biotype. Mentype® Auswertevorlagen (Template Files) für GeneMapper™ ID oder Genotyper® Software 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® Vorlagen für die GeneMapper™ ID/ID-X Software sind:

Panels	Biotype_Panels_v3a/v3X (Testkit auswählen)	oder höhere Version
BinSets	Biotype_Bins_v3a/v3X	oder höhere Version
Size Standard	SST-ROX_50-500bp (bis 450bp anpassen, Einstellung zuvor beschrieben)	
Analysis Method	Analysis_HID_310	
	Analysis_HID_3130	
	Analysis_HID_310_50rfu	
	Analysis_HID_3130_50rfu	
Plot Settings	Plots_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® Vorlagen für die GeneMapper™ ID-X Software:

Stutter*	Biotype_Stutter_v3X	oder höhere Version
----------	---------------------	---------------------

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

Die empfohlenen Biotype® Vorlagen für die Genotyper® Software sind:

für Standard Allelleiter	Nonaplex-QS_v1d	oder höhere Version
für extended Allelleiter	Nonaplex_QS-EXT_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. Probendaten auswerten

## 7. Kontrollen

Die im Testkit enthaltene Kontroll-DNA XY1 sowie kommerziell erhältliche DNAs repräsentieren folgende Allele:

**Tabelle 3. Allelzuordnungen mit Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup>**

Locus	Kontroll-DNA XY1	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenin	X / Y	X / X	X / X	X / Y	X / Y
D3S1358	17 / 18	16 / 16	14 / 15	15 / 17	16 / 18
D8S1179	9 / 10	12 / 12	13 / 13	12 / 13	15 / 16
D18S51	12 / 14	15 / 16	15 / 19	15 / 18	12 / 20
D21S11	27 / 28	29 / 30 / 31	30 / 30	29 / 30	28 / 29
FGA	20 / 26	21 / 24	23 / 24	24 / 26	18 / 23
SE33	17 / 21.2	26.2 / 28.2	19 / 29.2	23.2 / 26.2	22.2 / 27.2
TH01	6 / 9.3	9.3 / 9.3	8 / 9.3	6 / 9.3	7 / 9.3
WVA	15 / 18	16 / 16	17 / 18	17 / 17	14 / 19

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.umdj.edu/nigms>) erhältlich sind. Damit wird den Anforderungen von Szibor et al. (2003) entsprochen.

### Fragmentlängen und Allele

Die in **Tabelle 4** bis **Tabelle 9** angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA Längenstandard 550 (ROX) 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. Es wird empfohlen, bei jedem Lauf einen visuellen Abgleich mit der entsprechenden Allelleiter vorzunehmen.

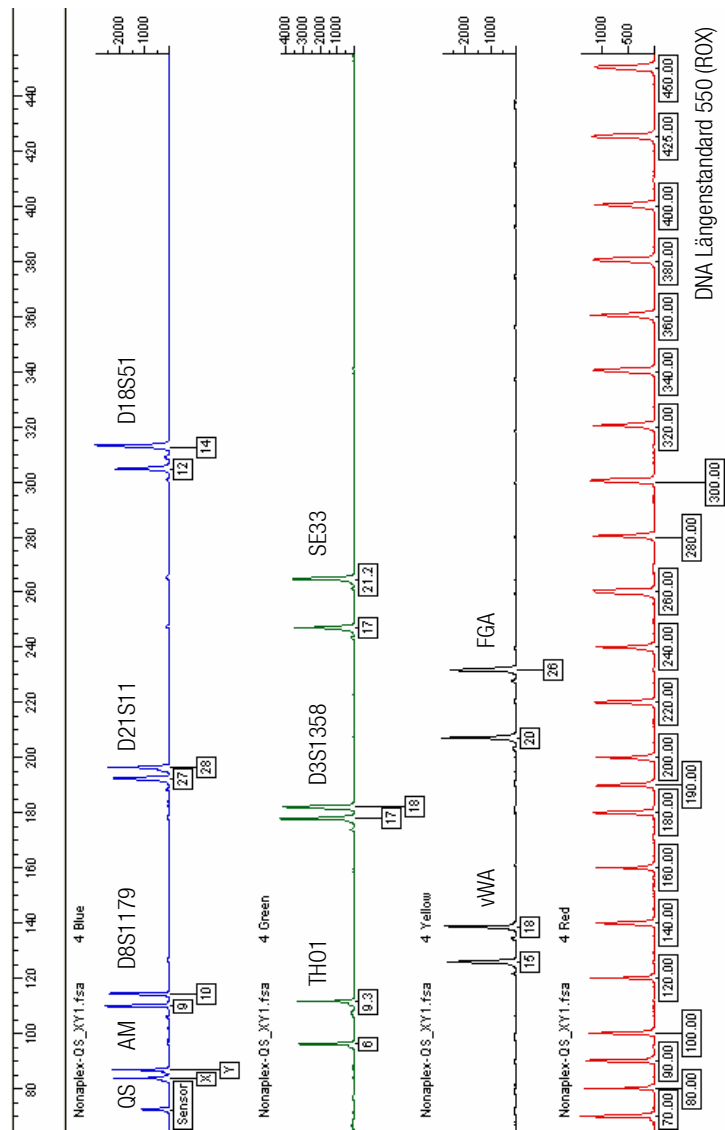
### Skalierung

Horizontal: 75-455 bp (mit Quality Sensor 65-455 bp)

Vertikal: nach Signalintensität der Proben



Abbildung 7



**Abb. 7** Elektropherogramm des Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup> unter Verwendung von 500 pg Kontroll-DNA XY1. Der Quality Sensors (QS) wird bei 72 bp amplifiziert. Die Analyse erfolgte am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer mit dem DNA Längenstandard 550 (ROX). Die Allelzuordnung wurde mit der Genotyper® Software und dem Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup> Template File durchgeführt.

Abbildung 8

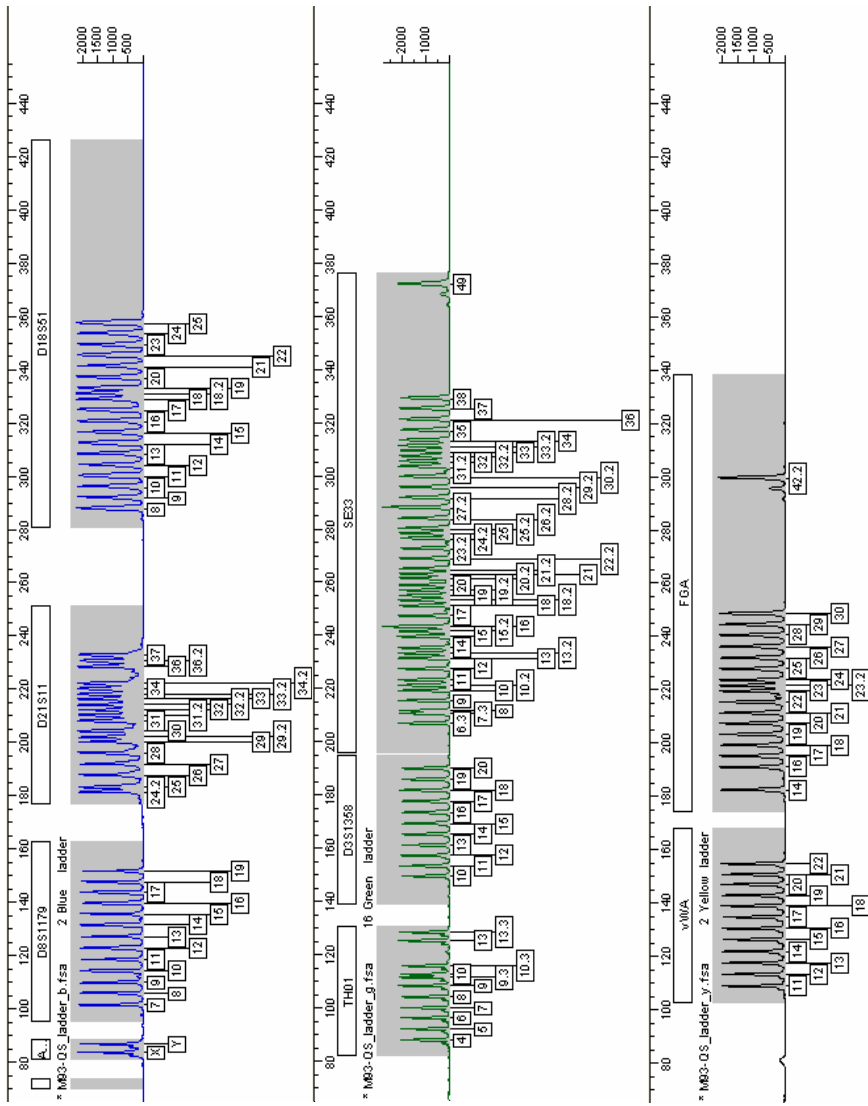


Abb. 8 Elektropherogramm der Allelleiter Mentype® Nonaplex<sup>OS</sup> analysiert am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Die Allelzuordnung wurde mit der Genotyper® Software und dem Mentype® Nonaplex<sup>OS</sup> Template File durchgeführt.

**Tabelle 4. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup> 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>PCR control</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D21S11</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D18S51</b>	<b>6-FAM</b>	
Quality Sensor	72		24.2	181	23.2, 24	8	288	7
			25	183	25.2	9	292	9.2
<b>Amelogen in</b>	<b>6-FAM</b>		26	188	26.2	10	296	10.2
X	83		27	192		11	300	11.2
Y	86		28	196	28.2, 28.3	12	304	12.2
			29	200		13	308	13.2
<b>D8S1179</b>	<b>6-FAM</b>		29.2	202	29.3	14	312	14.2
7	101		30	204	30.2	15	316	
8	106		31	208		16	320	16.2
9	110		31.2	210		17	325	17.2, 17.3
10	114		32	212		18	329	
11	118		32.2	214		18.2	331	
12	123		33	216	33.1	19	333	19.2
13	127		33.2	218		20	337	
14	131		34	220	34.1	21	341	21.2
15	135		34.2	222	35, 35.2	22	345	
16	140		36	228		23	349	23.1
17	144		36.2	230		24	353	
18	148		37	232	37.2, 38, 38.2, 39	25	357	26, 27, 28, 29
19	152	20						

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

\* 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)

**Tabelle 5. Fragmentlängen der Alleleiter Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup> 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>TH01</b>	<b>HEX</b>		<b>SE33</b>	<b>HEX</b>		<b>SE33</b>	<b>HEX</b>	
4	88	3	6.3	207	4.2, 5.3	24.2	276	24
5	92		7.3	211	7	25	278	
6	96	6.3	8	212	8.2	25.2	280	
7	100	7.3	9	216	9.2	26.2	284	26
8	104	8.3	10	219		<b>27.2†</b>	288	27
9	108	9.1	10.2	221		28.2	291	28, 28.3
9.3	111		11	223	11.2	29.2	295	29
10	112		12	227	12.2	30.2	299	30
10.3	116	11	13	231		31.2	303	31
13	125		13.2	233	13.3	32	305	
13.3	128		14	235	14.2, 14.3	32.2	307	
			15	239		33	309	
<b>D3S1358</b>	<b>HEX</b>		15.2	241		33.2	311	
10	149	8, 9	<b>16†</b>	243	16.2, 16.3	34	313	34.2
11	153		17	247	17.2, 17.3	35	317	35.2
12	157		18	251		36	321	36.2
13	161		18.2	253	18.3	37	325	37.2
14	165		19	255		38	329	39, 42
15	169		19.2	257		49	372	
16	173		20	259	20.1			
17	178		20.2	261				
18	182		21	263				
19	186		21.2	265				
20	190	21	22.2	269	22			
			23.2	272	23			

\* 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)

**Tabelle 6. Fragmentlängen der Alleleiter Mentye® Nonaplex<sup>QS</sup> gemessen am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer (gelber Panel)**

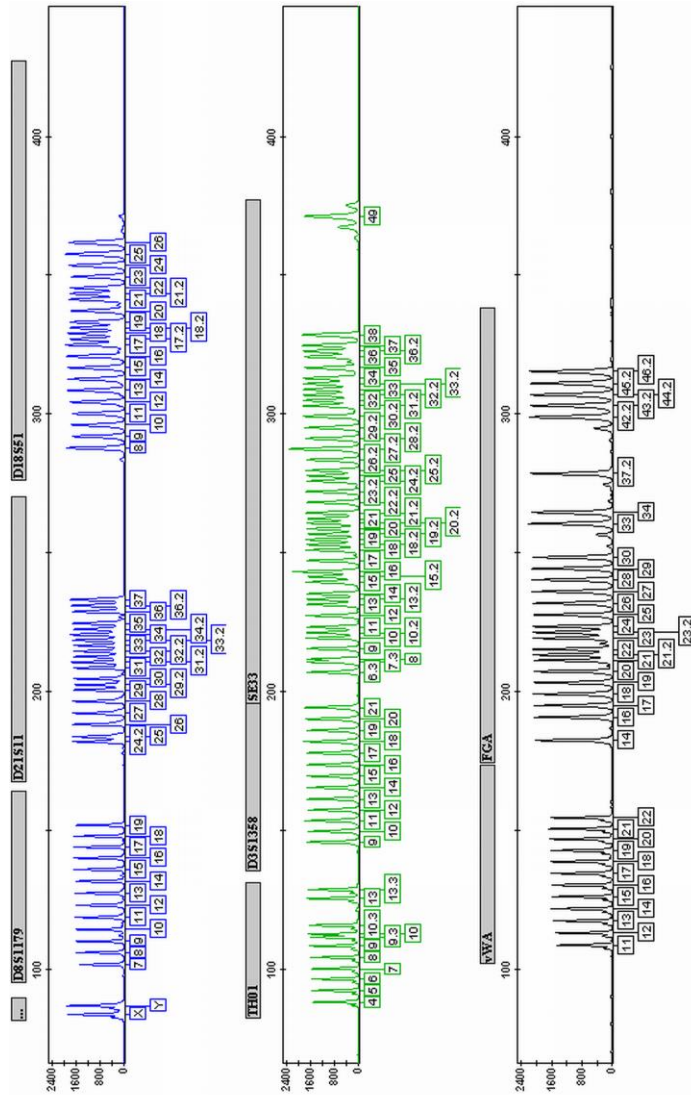
Marker /Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
<b>vWA</b>	<b>NED</b>		<b>FGA</b>	<b>NED</b>	
11	108	10	14	182	15
12	113		16	191	16.1
13	117		17	195	
14	122		18	199	18.2
15	126		19	203	19.2
16	130		20	207	20.2
17	134		21	211	21.2
18	138		22	215	22.2
19	142		23	219	
20	146		23.2	221	23.3
21	150		24	223	24.1, 24.2
22	154	23, 24	25	227	25.2
			26	231	26.2
			27	235	
			28	240	
			29	244	
			30	248	30.2, 31, 31.2, 32.2, 33, 33.2, 34, 37.2
			42.2	299	43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2

\* 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)

**Abbildung 9**

Zusätzlich zum Testkit kann die Allelleiter Mentype® **Nonaplex<sup>QS</sup> extended** (Art. Nr. 48-09330-0010) erworben werden.



**Abb. 9** Elektropherogramm der Allelleiter Mentype® **Nonaplex<sup>QS</sup> extended** analysiert am ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Die Allelzuordnung wurde mit der GeneMapper™ ID Software und dem Mentype® **Nonaplex<sup>QS</sup> extended** Template File durchgeführt.

**Tabelle 7. Fragmentlängen der Alleleiter Mentye® Nonaplex<sup>QS</sup> extended gemessen amABI 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>PCR control</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D21S11</b>	<b>6-FAM</b>		<b>D18S51</b>	<b>6-FAM</b>	
Quality Sensor	72		24.2	181	23.2, 24	8	288	7
			25	183	25.2	9	292	9.2
<b>Amelogen in</b>	<b>6-FAM</b>		26	188	26.2	10	296	10.2
X	83		27	192		11	300	11.2
Y	86		28	196	28.2, 28.3	12	304	12.2
			29	200		13	308	13.2
<b>D8S1179</b>	<b>6-FAM</b>		29.2	202	29.3	14	312	14.2
7	101		30	204	30.2	15	316	
8	106		31	208		16	320	16.2
9	110		31.2	210		17	325	
10	114		32	212		<b>17.2†</b>	327	17.3
11	118		32.2	214		18	329	
12	123		33	216	33.1	18.2	331	
13	127		33.2	218		19	333	19.2
14	131		34	220	34.1	20	337	
15	135		34.2	222		21	341	
16	140		<b>35†</b>	224	35.2	<b>21.2†</b>	343	
17	144		36	228		22	345	
18	148		36.2	230		23	349	23.1
19	152	20	37	232	37.2, 38, 38.2, 39	24	353	
						25	357	
						<b>26†</b>	361	27, 28, 29

† Diese Allele werden zur besseren Orientierung innerhalb der Alleleiter verstärkt dargestellt.

\* 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)

**Tabelle 8. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Nonaplex<sup>QS</sup> extended 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>TH01</b>	<b>HEX</b>		<b>SE33</b>	<b>HEX</b>		<b>SE33</b>	<b>HEX</b>	
4	88	3	6.3	207	4.2, 5.3	25	278	
5	92		7.3	211	7	25.2	280	
6	96	6.3	8	212	8.2	26.2	284	26
7	100	7.3	9	216	9.2	<b>27.2†</b>	288	27
8	104	8.3	10	219		28.2	291	28, 28.3
9	108	9.1	10.2	221		29.2	295	29
9.3	111		11	223	11.2	30.2	299	30
10	112		12	227	12.2	31.2	303	31
10.3	116	11	13	231		32	305	
13	125		13.2	233	13.3	32.2	307	
13.3	128		14	235	14.2, 14.3	33	309	
			15	239		33.2	311	
<b>D3S1358</b>	<b>HEX</b>		15.2	241		34	313	34.2
<b>9†</b>	145	8	<b>16†</b>	243	16.2, 16.3	35	317	35.2
10	149		17	247	17.2, 17.3	36	321	
11	153		18	251		<b>36.2†</b>	323	
12	157		18.2	253	18.3	37	325	37.2
13	161		19	255		38	329	39, 42
14	165		19.2	257		49	372	
15	169		20	259	20.1			
16	173		20.2	261				
17	178		21	263				
18	182		21.2	265				
19	186		22.2	269	22			
20	190		23.2	272	23			
<b>21†</b>	194		24.2	276	24			

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

\* 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)



**Tabelle 9. Fragmentlängen der Alleleiter Mentye® Nonaplex<sup>QS</sup> extended gemessen am ABI PRISM® 310/3130 Genetic Analyzer (gelber Panel)**

Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/ Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
<b>vWA</b>	<b>NED</b>		<b>FGA</b>	<b>NED</b>	
11	108	10	14	182	15
12	113		16	191	16.1
13	117		17	195	
14	122		18	199	18.2
15	126		19	203	19.2
16	130		20	207	20.2
17	134		21	211	
18	138		<b>21.2†</b>	213	
19	142		22	215	22.2
20	146		23	219	
21	150		23.2	221	23.3
22	154	23, 24	24	223	24.1, 24.2
			25	227	25.2
			26	231	26.2
			27	235	
			28	240	
			29	244	
			30	248	30.2, 31, 31.2
			<b>33†</b>	260	32.2, 33.2
			<b>34†</b>	264	
			<b>37.2†</b>	278	
			42.2	299	
			<b>43.2†</b>	303	
			<b>44.2†</b>	307	
			<b>45.2†</b>	311	
			<b>46.2†</b>	315	47.2, 48.2, 50.2, 51.2

\* 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 sind nicht in der Alleleiter Mentye® Nonaplex<sup>QS</sup> enthalten.

## 8. Interpretation der Ergebnisse

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

### Überstrahlungen (Pull-up Peaks)

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

### Stotterbanden (Stutter Peaks)

Das Auftreten von Stotterbanden hängt von der Sequenz und Anzahl der Wiederholungseinheiten ab. Bei Tetranukleotid STR Motiven entstehen 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 Analyzelabor hierfür eigene Grenzwerte festlegen.

### Qualitätssensor zur Kontrolle der Polymerase-Kettenreaktion

Mentype<sup>®</sup> Nonaplex<sup>QS</sup> ist mit einer internen PCR-Kontrolle ausgestattet, die dem Anwender zusätzliche Informationen zur Analysierbarkeit der Proben liefert (Abb. 6). Ein Ausfall des Sensors ist bei vollständiger Inhibition der PCR oder Fehlern im Assay gegeben. Wird das Sensorsignal in der Negativkontrolle ohne DNA bzw. in der Positivkontrolle mit Kontroll-DNA amplifiziert, ist keine PCR Inhibition gegeben. Proben mit ausreichend DNA ohne inhibitorische Substanzen ergeben somit ein dem Test entsprechendes DNA-Profil sowie das Sensorfragment. Verminderte Peakhöhen des Sensors in forensischen Proben bedeuten dagegen partielle Hemmung der PCR. Werden nur noch Amelogenin und der Qualitätssensor amplifiziert, so enthält die Probe wahrscheinlich sehr wenig oder stark degradierte DNA.

### 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.

## 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.

**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.