

Mentype[®] Nonaplex I

PCR Amplification Kit

Gebrauchsanweisung

Das Mentype[®] **Nonaplex I** 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



27. März 2023



41-09113-0100
41-09113-0400



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
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
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®, 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

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. Protokolle für die Amplifikation und Elektrophorese.....	8
2.1 PCR Amplifikation	8
2.2 Elektrophorese am Applied Biosystems™ 3130/3130XL Genetic Analyzer	10
2.3 Elektrophorese am Applied Biosystems™ 3500/3500XL Genetic Analyzer	16
2.4 Probenvorbereitung für die Analyse am Genetic Analyzer.....	18
3. Auswertung	19
4. BIOTYPE Auswertevorlagen	20
5. Kontrollen	21
6. Fragmentlängen und Allele	21
7. Interpretation der Ergebnisse	27
8. Referenzen	28

1. Produktbeschreibung

Das Mentype® **Nonaplex I** 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. Die Primer sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen **6-FAM** (Amelogenin, D3S1358, TH01 und SE33), **HEX** (vWA, FGA und D18S51) oder **NED** (D8S1179 und D21S11) markiert. Bei der Zusammenstellung des Primergemisches wurde besonders auf eine ausgewogene Signalintensität der einzelnen DNA-Systeme geachtet.

Die Nachweisgrenze für das Mentype® **Nonaplex I** Testkit liegt bei weniger als **200 pg genomischer DNA**. Wir empfehlen den Einsatz von **0.5-1.0 ng DNA**.

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurden am GeneAmp® 9700 Thermocycler, Applied Biosystems™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems™ 3100/3130 Genetic Analyzer und Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer durchgeführt.

Tabelle 1. Locus-spezifische Informationen für Mentype® Nonaplex I

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

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 I PCR Amplification Kit

Reagenz	100 rkt.	400 rkt.
Nuklease-freies Wasser / Nuclease-free water	2 x 1.5 mL	6 x 1.5 mL
Reaktionsgemisch B / Reaction mix B	500 µL	2 x 1.0 mL
Primergemisch / Primer mix	250 µL	4 x 250 µL
DNA Polymerase / DNA polymerase	40 µL	160 µL
Kontroll-DNA XY82 / Control DNA XY82 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL
DNA Längenstandard 550 / DNA Size Standard 550 (ROX)	50 µL	200 µL
Allelleiter / Allelic ladder	10 µL	4 x 10 µL

Lagerung

Die Lagerung über einen längeren Zeitraum empfehlen wir bei – 25 °C bis – 15 °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:

Reagenz	Lieferant	Bestellnummer
Hi-Di™ Formamide, 25 mL	Thermo Fisher Scientific Inc.	4311320
Matrix Standards DS-30 für Applied Biosystems™ multi-capillary instruments	Thermo Fisher Scientific Inc.	4345827

2. Protokolle für die Amplifikation und Elektrophorese

2.1 PCR Amplifikation

Ansatz des Master Mixes

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der eingesetzten PCR Reagenzien 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*	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 Mg²⁺, 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 ausverdünnung werden. Die Menge an Nuklease-freiem Wasser ist entsprechend zu korrigieren, sodass das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes immer 25 µL beträgt.

Lagern Sie Ihre DNA-Proben in Nuklease-freiem Wasser oder in verdünntem TE Puffer (10 mM Tris HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA), z.B. 0,1x TE Puffer.

Die Primergemische sind so eingestellt, dass bei **30 PCR-Zyklen** mit **0,5 ng Kontroll-DNA XY82** 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 XY82 auf 0,5 ng in dem entsprechenden Volumen. Pipettieren Sie die verdünnte Kontroll-DNA anstelle der Template-DNA in die Reaktionsgefäße mit dem vorgelegten PCR Master Mix.

Negativkontrolle

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

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	
58°C	120 s	30 Zyklen
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	
58°C	120 s	34 Zyklen
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.

2.2 Elektrophorese am Applied Biosystems™ 3130/3130XL Genetic Analyzer

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

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 im Dye Set D 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.

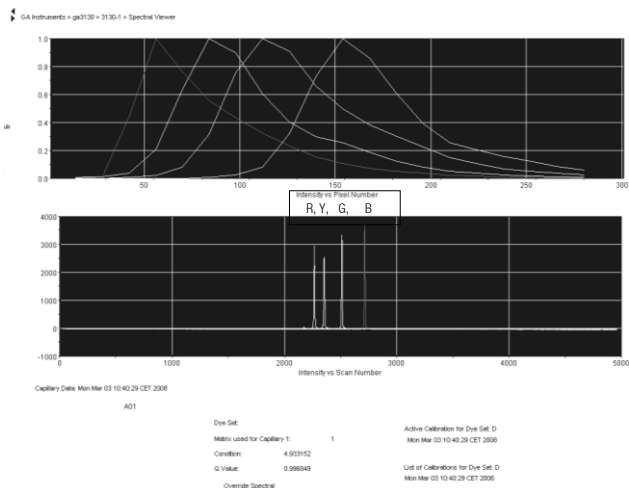


Abb. 4 Elektropherogramm der Spektralkalibrierung mit Matrix Standards DS-30 am ABI 3130

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
<hr/>	
12 µL Gemisch (Formamid+ Längenstandard) für alle Proben vorlegen	
1 µL PCR-Produkt (ggf. verdünnt) oder Allelleiter zugeben	
<hr/>	
- 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 (ROX) auf Peakhöhen von ca. 500 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)
- Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Analyse

Vorbereitung des Run Moduls

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]	3.0
Injection Time [s]*	10
Voltage Number of Steps	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time [s]	Default
Run Voltage [kV]	Default
Run Time [s]**	1320

* 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 I** angepasst worden, damit Fragmente bis zu einer Länge von **400 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 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_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 Plattenditor.

GeneMapper™ Plattenditor (II)

Parameter	Einstellung
Sample Name	Benennung der Probe
Priority	z.B. 100 (Voreinstellung)
Sample Type	Probe oder Alleleiter
Size Standard	z.B. SST-ROX_50-400bp
Panel	z.B. Nonaplex_I_Panels_v3/v3x
Analysis Method	z.B. Analysis_HID_Nonal
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 zufügen und mit **OK** bestätigen.
- Im **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 Analyselabor festgelegt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte mindestens 3x so hoch sein wie das Grundrauschen der Basislinie.

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

2.3 Elektrophorese am Applied Biosystems™ 3500/3500XL Genetic Analyzer

Allgemeine Anweisungen zum Analysegerät, zur Spektralkalibrierung und der Anwendung der Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software und der GeneMapper™ ID/ID-X Software, können dem entsprechenden *Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* entnommen werden.

Für den kombinierten Einsatz der fünf Fluoreszenzfarbstoffe **6-FAM, HEX, NED** und **ROX** ist die Nutzung des virtuellen **Filter Sets F** vorgesehen (der Matrix Standard wird im Folgenden als **DS-30** bezeichnet).

Material

Kapillare	36 cm Capillary Array for 3500/3500xL
Polymer	POP-4® Polymer for 3500/3500xL

Spektralkalibrierung / Matrixerstellung

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse muss zunächst eine Spektralkalibrierung mit PCR-Fragmenten der entsprechenden fünf 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 des Matrix Standards zur Spektralkalibrierung

- Laden des Standards in die 96-Well Platte (je Kapillare eine Probe)
- Vorbereitung des Instruments für die Erstellung Dye Set DS-30
- Durchführung des Laufs zur Spektalkalibrierung und prüfen der Matrix

Vorbereitung des Matrixstandards zur Spektalkalibrierung

Beispiel für 8 Kapillaren/ABI 3500

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	98.0 µl
Matrix Standard DS-30	2.0 µl

- 10 µl des Gemisches in eine 96-Well Platte laden, z.B. Position **A1-H1**
- 3 min bei 95 °C denaturieren
- abkühlen auf 4 °C und zur Analyse in das Gerät stellen

Beispiel für 24 Kapillaren/ABI 3500xL

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	294.0 µl
Matrix Standard DS-30	6.0 µl

- 10 µl des Gemisches in eine 96-Well Platte laden, z.B. Position **A1-H1, A2-H2 and A3-H3***
- 3 min bei 95 °C denaturieren
- abkühlen auf 4 °C und zur Analyse in das Gerät stellen

* Bei Verwendung einer 384-Well Platte sollten 10 µl des Gemisches in die Positionen 1, 3, und 5 der Reihen A, C, E, G, I, K, M, und O gegeben werden

Vorbereitung des Instruments

Stellen Sie sicher, dass vor der Spektalkalibrierung eine **Spatial Calibration** erfolgt ist. Dieser Schritt ist nur nach dem Einbau eines neuen Capillary Arrays nötig. Der Prozess ist detailliert im *Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* aufgeführt.

Durchführung der Spektalkalibrierung

Geben Sie die Multi-Well Platte nach Beladen mit dem Gemisch für die Spektalkalibrierung in den Autosampler und starten Sie die Spektalkalibrierung.

1. Wählen Sie **Maintenance** auf dem Dashboard der 3500 Series Data Collection Software, um den Spectral Calibration Screen zu öffnen.
2. Die Anzahl der Kavitäten der Multi-Lochplatte sowie deren Position im Instrument muss angegeben werden.
3. Wählen Sie **Matrix Standard** als Chemistry Standard und **DS-30** für das Dye Set (zuvor erstellt).
4. Aktivieren sie **Allow Borrowing** (optional).
5. Klicken Sie **Start Run**.

Matrix prüfen

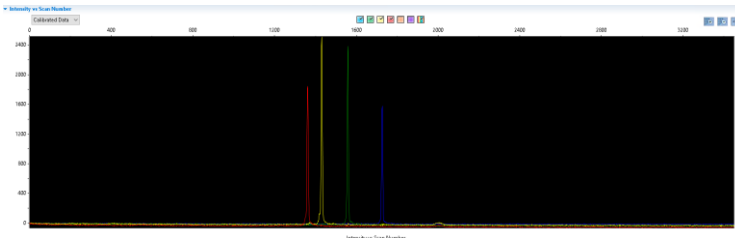


Abb. 5. Elektropherogramm der Spektralkalibrierung mit dem Matrix Standard DS-30 auf dem ABI 3500 Instrument.

- Jede Kapillare sollte einen Qualitätswert (**Q Value**) größer als 0.8 sowie eine Konditionszahl (**Condition number range**) zwischen 1 und 20 haben
- Bewerten Sie, ob eine stabile Basislinie vorhanden ist. Es müssen fünf Peaks mit Peakhöhen von 1000-5000 RFU (Y-Achse) in jeder Kapillare erkennbar sein (optimaler Bereich: 2000-4000 RFU), siehe Abbildung
- Eine erfolgreiche Kalibrierung wird für jede Kapillare in **Overall** in grün angezeigt.
- Wurden alle Kapillaren erfolgreich kalibriert klicken Sie **Accept Results**
- War die Kalibrierung nicht erfolgreich klicken Sie **Reject Results**. In diesem Fall verweisen wir auf das Kapitel "spectral calibration troubleshooting" des *Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guides*

2.4 Probenvorbereitung für die Analyse am Genetic Analyzer

Komponente	Volumen
Hi-Di™ Formamide	12.0 µl
DNA Längenstandard 550 (ROX)	0.5 µl

12 µl Gemisch (Formamid + DNA Längenstandard 550) für alle Proben vorlegen

1 µl PCR-Produkt (ggf. verdünnt) oder Allelleiter zugeben

- 3 min bei 95 °C denaturieren

- abkühlen auf 4 °C und zur Analyse in das Gerät stellen

Da die Injektion gleichzeitig an allen Kapillaren stattfindet, müssen am Mehrkapillargerät immer 8 oder 24 Proben auf der Platte pipettiert werden. Falls weniger Proben zu messen sind, müssen die entsprechenden Positionen mit 12 µl Hi-Di™ Formamide aufgefüllt werden.

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. Optimal sind stabile Raumtemperaturen > 22 °C.

3. Auswertung

Allgemeine Anweisungen zur automatischen Auswertung können der entsprechenden Anleitung *GeneMapper™ ID/ ID-X Software User's Manual* entnommen werden.

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

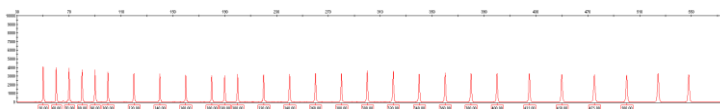


Abb. 6 Elektropherogramm des DNA-Längenstandard 550 (ROX), Fragmentlängen in bp

Anmerkung: Die Grundvorlage des DNA-Längenstandards 550 (ROX) für GeneMapper™ ID/ ID-X Software muss für den Mentype® **Nonaplex I** auf 400 bp angepasst werden. Die neue Vorlage kann unter dem Namen SST-ROX_50-400bp gespeichert und für weitere Analysen verwendet werden.

4. BIOTYPE Auswertevorlagen

Die Allelzuordnungen der aufgetrennten PCR-Produkte (Genotyping) kann mit Hilfe geeigneter Auswertungssoftware erfolgen, z.B. mit GeneMapper™ ID oder ID-X Software in Kombination mit Mentype® **Nonaplex I** Auswertevorlagen der BIOTYPE. Mentype® Auswertevorlagen (Template Files) für GeneMapper™ ID oder ID-X Software finden Sie auf unserer Homepage (www.biotype.de) zum Download oder auf Anfrage durch support@biotype.de.

Die empfohlenen Biotype Vorlagen für die GeneMapper™ ID/ID-X Software sind:

Panels	Nonaplex_I_Panels_v3/v3x	oder höhere Version
BinSets	Nonaplex_I_Bins_v3/v3x	oder höhere Version
Size Standard	SST-ROX_50-500bp (bis 400bp anpassen, Einstellung zuvor beschrieben)	
Analysis Method	Analysis_HID_Nonal	
	Analysis_HID_Nonal_5Orfu	
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*	Nonaplex_I_Stutter_v3X	oder höhere Version
----------	------------------------	---------------------

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

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. Probanden auswerten

5. Kontrollen

Die im Testkit enthaltene Kontroll-DNA XY82 sowie kommerziell erhältliche DNAs repräsentieren folgende Allele:

Tabelle 3. Allelzuordnungen mit Mentype® Nonaplex I

Locus	Kontroll-DNA XY82	Kontroll-DNA XY1	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenin	X / Y	X / Y	X / X	X / X	X / Y	X / Y
D3S1358	16 / 17	17 / 18	16 / 16	14 / 15	15 / 17	16 / 18
D8S1179	8 / 14	9 / 10	12 / 12	13 / 13	12 / 13	15 / 16
D18S51	13 / 16	12 / 14	15 / 16	15 / 19	15 / 18	12 / 20
D21S11	30 / 31	27 / 28	29 / 30 / 31	30 / 30	29 / 30	28 / 29
FGA	22 / 26	20 / 26	21 / 24	23 / 24	24 / 26	18 / 23
SE33	27.2 / 28.2	17 / 21.2	26.2 / 28.2	19 / 29.2	23.2 / 26.2	22.2 / 27.2
TH01	6 / 9	6 / 9.3	9.3 / 9.3	8 / 9.3	6 / 9.3	7 / 9.3
vWA	15 / 17	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.

6. Fragmentlängen und Allele

Die in **Tabelle 4** bis **Tabelle 6** angegebenen Werte für Fragmentlängen einzelner Allele beziehen sich auf den DNA-Längenstandard 550 (ROX) und die Messung am Applied Biosystems™ 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: 75-405 bp

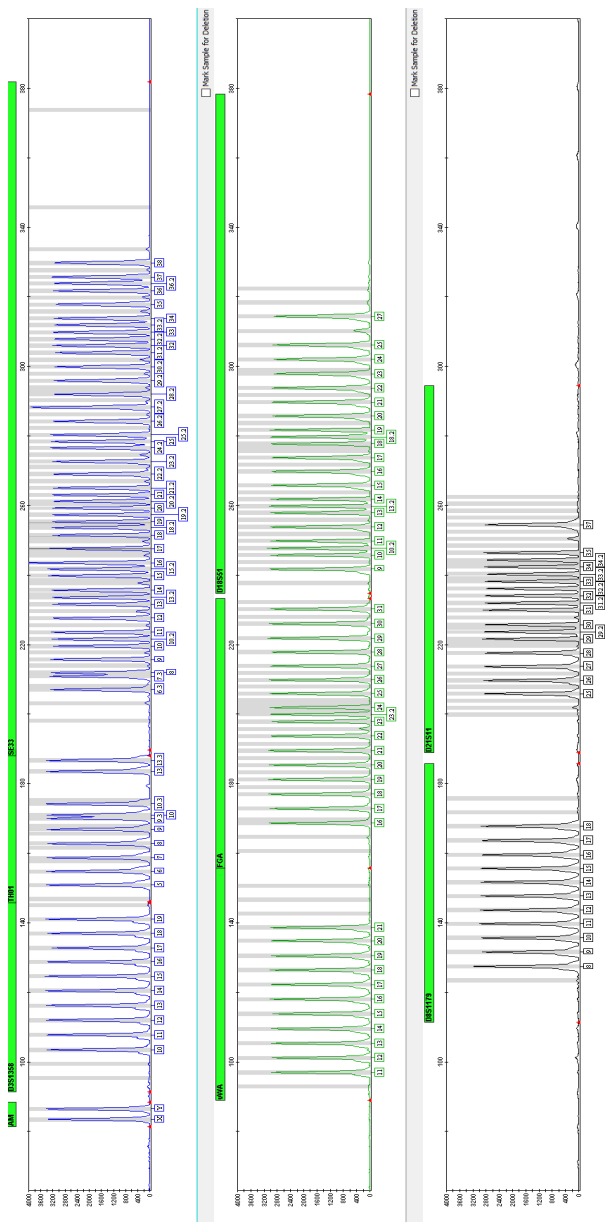
Vertikal: nach Signalintensität der Proben

Abbildung 7



Abb. 7 Elektropherogramm des Mentype® **Nonaplex I** unter Verwendung von 500 pg Kontroll-DNA XY82. Die Analyse erfolgte am Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer mit dem DNA-Längenstandard 550 (ROX) Die Allelzuordnung wurde mit der Genotyper® Software und dem Mentype® **Nonaplex I** Template File durchgeführt.

Abbildung 8



Mentype® Nonplex I

Abb. 8 Elektrophogramm der Alleleiter Mentype® Nonplex I analysiert am Applied Biosystems™ Genetic Analyzer. Die Allelzunordnung wurde mit der GeneMapper™ ID-X Software und dem Mentype® Nonplex I Template File durchgeführt.

NONAUF02v2de

Tabelle 4. Fragmentlängen der Alleleiter Mentyte® Nonaplex I gemessen am Applied Biosystems™ 3130 Genetic Analyzer (blauer Panel)

Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
Amelogenin	6-FAM		SE33	6-FAM		SE33	6-FAM	
X	83		6.3	207	4.2, 5.3	25	278	
Y	86		7.3	211	7	25.2	280	
			8	212	8.2	26.2	283	26
D3S1358	6-FAM		9	215	9.2	27.2†	287	27
10	104	8, 9	10	219		28.2	291	28, 28.3
11	108		10.2	221		29.2	295	29
12	112		11	223	11.2	30.2	299	30
13	117		12	227	12.2	31.2	303	
14	121		13	231		32	305	
15	125		13.2	233	13.3	32.2	307	
16	130		14	235	14.2, 14.3	33	309	
17	134		15	239		33.2	311	
18	138		15.2	241		34	313	34.2
19	142	20	16†	243	16.2, 16.3	35	317	35.2
			17	247	17.2, 17.3	36	321	
TH01	6-FAM		18	251		36.2	323	
5	152	4	18.2	253	18.3	37	325	37.2, 39, 42
6	155	6.3	19	255		38	329	49
7	159	7.3	19.2	257				
8	163	8.3	20	259	20.1			
9	167	9.1	20.2	261				
9.3	170		21	262				
10	171		21.2	264				
10.3	174	11	22.2	268	22			
13	184		23.2	272	23			
13.3	187		24.2	276	24			

† 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 GeneMapper™ ID/ID-X Software zugeordnet. Für weitere Allele siehe u.a. http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

Tabelle 5. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Nonplex I gemessen am Applied Biosystems™ 3130 Genetic Analyzer (grüner Panel)

Marker/Allel Größe [bp]*			Marker/Allel Größe [bp]*			Marker/Allel Größe [bp]*		
		Weitere Allele**			Weitere Allele**			Weitere Allele**
vWA	HEX		FGA	HEX		D18S51	HEX	
11	98	10	16	170	14, 15, 16.1	9	243	8, 9.2
12	102		17	174		10	247	
13	106		18	178	18.2	10.2	249	
14	110		19	182	19.2	11	251	11.2
15	115		20	187	20.2	12	255	12.2
16	119		21	191	21.2	13	259	
17	123		22	195	22.2	13.2	261	
18	128		23	199		14	263	14.2
19	132		23.2	201	23.3	15	267	
20	136		24	203	24.1, 24.2	16	271	16.2
21	140	22, 23, 24	25	207	25.2	17	275	17.2, 17.3
			26	211	26.2	18	279	
			27	215		18.2	281	
			28	219		19	283	19.2
			29	223		20	287	
			30	228	30.2	21	291	21.2
			31	232	31.2	22	295	
						23	299	23.1
						24	303	
						25	308	26
						27	316	28, 29

* gerundet auf ganze Zahlen

** Diese „off-ladder“ Allele des BIOTYPE DNA Pools werden mit den aktuellen BIOTYPE Template Files für die GeneMapper™ ID/ ID-X Software zugeordnet. Für weitere Allele siehe u.a. http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

Tabelle 6. Fragmentlängen der Allelleiter Mentype® Nonaplex I gemessen am Applied Biosystems™ 3130 Genetic Analyzer (gelber Panel)

Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**	Marker/Allel	Größe [bp]*	Weitere Allele**
D8S1179	NED		D21S11	NED	
8	129	7	25	206	23.2, 24, 24.2, 25.2
9	133		26	210	26.2
10	137		27	214	
11	141		28	218	28.2, 28.3
12	145		29	222	
13	149		29.2	224	29.3
14	153		30	226	30.2
15	157		31	231	
16	161		31.2	233	
17	165		32	235	
18	169	19, 20	32.2	237	
			33	239	33.1
			33.2	241	
			34	243	34.1
			34.2	245	
			35	247	35.2, 36, 36.2
			37	255	37.2, 38, 38.2, 39

* gerundet auf ganze Zahlen

** Diese „off-ladder“ Allele des BIOTYPE DNA Pools werden mit den aktuellen BIOTYPE Template Files für die GeneMapper™ ID/ ID-X Software zugeordnet. Für weitere Allele siehe u.a. http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

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) (für Applied Biosystems™ 310/3130 Genetic Analyzer) oder größer 10.000 RFU (Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer) 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 besagte Grenzwerte 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 GeneMapper™ ID oder ID-X Software.

Template-unabhängige Anheftung von Nukleotiden

Die Taq DNA Polymerase hängt aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität bevorzugt ein Adenosin an das 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments an. Wenn dem PCR-System nicht genügend Zeit für die Extension zur Verfügung steht oder wenn die Primersequenzen die Extension nicht begünstigen, findet diese Anheftung nicht statt. Dieses Artefakt ist durch das Auftreten eines um eine Base verkürzten Fragments (-1 Peak) erkennbar. Alle Biotype Primer sind so gestaltet, dass diese Artefaktbildung minimiert wird. Zusätzlich wird die Bildung des Artefakts durch den abschließenden Extensionsschritt im PCR-Protokoll (68°C für 60 min) reduziert. Die Peakhöhe des Artefakts nimmt bei hohen DNA-Mengen zu. Zur Bewertung der Peaks sollte jedes Analyiselabor hierfür eigene Grenzwerte festlegen.

Artefakte

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

8. 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.