

Mentype[®] **DigitalQuant**

Sensitive und akkurate absolute DNA-Quantifizierung

Handbuch

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für medizinische Diagnostik

DGQHB01v1de
März 2022



45-02xx1*-0025



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

*"xx" definiert das entsprechende DIP des Mentype[®] **DigitalQuant** Assays

Made in Germany

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Produktbeschreibung | 4 |
| 1.1 Zusammenfassung und Erläuterung | 4 |
| 1.2 Plattform und Software | 5 |
| 2. Mitgelieferte Materialien | 6 |
| 2.1 Kitinhalt | 6 |
| 2.2 Bestellinformation | 6 |
| 3. Warn- und Sicherheitshinweise | 7 |
| 3.1 Sicherheitshinweise | 7 |
| 3.2 Qualitätskontrolle | 7 |
| 3.3 Marken und Patente | 7 |
| 3.4 Lagerung und Handhabung der Reagenzien | 7 |
| 4. Durchführung Mentype® DigitalQuant – Allgemeine Informationen | 8 |
| 4.1 Probenentnahme und -Handhabung | 8 |
| 4.2 Optional: Bestimmung des Allelstatus der informativen Loci | 8 |
| 4.3 Quantifizierungs-Protokoll | 8 |
| 5. Durchführung bei Verwendung der Plattform QX100™/QX200™ | 9 |
| 5.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien | 9 |
| 5.2 Ansetzen des Mentype® DigitalQuant Mastermixes | 9 |
| 5.2.1. Positiv-Kontrolle (nicht im Kit enthalten) | 10 |
| 5.2.2. Negativ-Kontrolle | 10 |
| 5.3 Restriktionsverdau | 10 |
| 5.4 Ansetzen der Droplet Digital PCR - Tröpfchenerzeugung | 10 |
| 5.5 Digital PCR Amplifikation | 11 |
| 5.6 Auslesen der Tröpfchen und Analysieren der Ergebnisse | 12 |
| 5.6.1. Erstellen des Platten-Layouts | 12 |
| 5.6.2. Datenanalyse | 12 |
| 5.7 Mindestanforderungen an Dropletdaten vor der Berechnung | 13 |
| 6. Durchführung bei Verwendung der Plattform QuantStudio™ 3D | 14 |
| 6.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte | 14 |
| 6.2 Ansetzen des Mentype® DigitalQuant Mastermixes | 14 |
| 6.2.1. Positiv-Kontrolle (nicht im Kit enthalten) | 15 |
| 6.2.2. Negativ-Kontrolle | 15 |
| 6.3 Beladen der QuantStudio™ 3D Chips | 15 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.4 Amplifikationsparameter | 16 |
| 6.5 Auslesen der QuantStudio™ 3D Chips | 16 |
| 6.6 Analyse der Rohdaten..... | 16 |
| 6.6.1. Software Vorbereitung | 17 |
| 6.6.2. Ansicht der Daten..... | 17 |
| 6.6.3. Anpassung der Daten | 19 |
| 6.6.4. Export der Daten | 19 |
| 6.7 Mindestanforderungen an Chipdaten vor der Berechnung | 19 |
| 7. Berechnung der absoluten DNA-Anteile | 21 |
| 8. Verfügbarkeit und Charakteristik der Mentype® DigitalQuant Assays..... | 22 |
| 9. Referenzen | 23 |
| 10. Technische Unterstützung..... | 23 |
| 11. Bestelldetails der Mentype® DigitalQuant Assays..... | 24 |

Mentype® **DigitalQuant** Amplifikationskit

Nur für Forschungszwecke

Zur sensitiven und absoluten DNA-Quantifizierung

1. Produktbeschreibung

Das Testkit Mentype® **DigitalQuant** ist zur absoluten Quantifizierung von DNA-Anteilen aus Mischproben bestimmt. Das Testkit darf nur von professionellen Nutzern angewendet werden, die auf molekular-biologische Techniken im Allgemeinen und die Durchführung der digitalen PCR im Besonderen geschult sind.

Das Testkit darf nur für Forschungszwecke verwendet werden, eine Nutzung zu diagnostischen Zwecken ist nicht gestattet.

1.1 Zusammenfassung und Erläuterung

Der Mentype® **DigitalQuant** Ansatz setzt die hochempfindliche digitale PCR-Technologie ein, die eine absolute Quantifizierung der DNA ermöglicht. Spezifisch für die digitale PCR (dPCR) ist die Proben-Partitionierung in eine große Anzahl von Kompartimenten. Jedes Kompartiment stellt ein separates Reaktionsgefäß dar, welches Nano-Liter der Probe enthält und als separate PCR-Reaktionskammer fungiert. Je nachdem, wie viele Exemplare der Ziel-DNA-Moleküle in die Kompartimente aufgeteilt wurden (Null, eine oder mehrere Kopien), wird eine Vielzahl von Replikaten in jedem einzelnen PCR-Lauf erzeugt. Mit Hilfe der Poisson-Statistik kann die absolute Anzahl der Startkopien sehr genau bestimmt werden. Nach der PCR wird jedes Kompartiment automatisch analysiert und für die Ziel-DNA der positive oder negative Anteil bestimmt. Da bei der digitalen PCR der end-point Nachweis des Amplifikationsprodukts verwendet wird, sind Kalibrierungskurven nicht erforderlich.

Mentype® **DigitalQuant**-Assays wurden entwickelt, um zuvor identifizierte DIP-Loci (Deletion-Insertion-Polymorphismus, auch INDEL genannt) quantitativ zu analysieren. Diese Assays stellen ein Set von 29 verschiedenen DIP-Allelen dar und sind als Duplexmischungen entweder in Kombination mit β -Globin als aktiver Referenz (REF) oder mit SRY als Y-Chromosom-spezifischer Marker erhältlich. Zusätzlich wird eine Kombination von SRY / REF als Assay bereitgestellt.

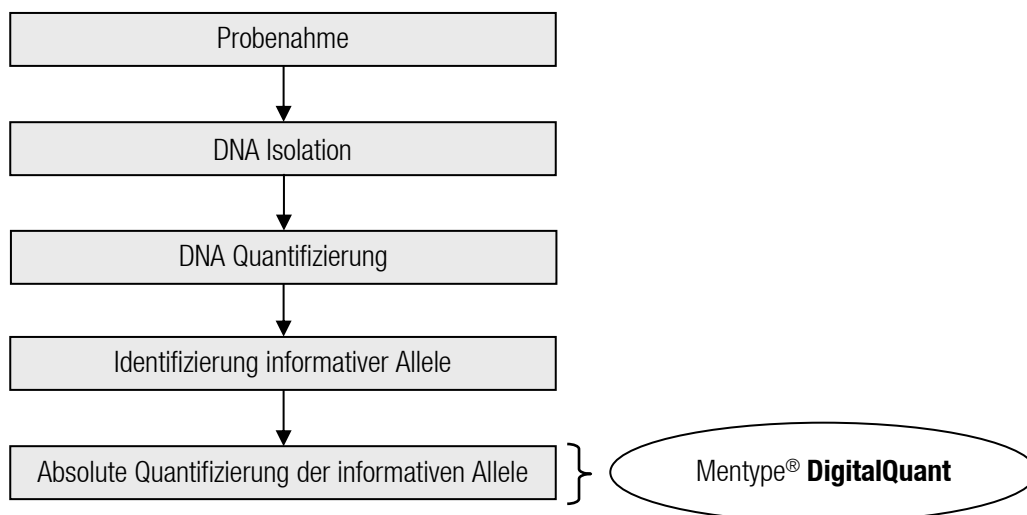


Abbildung 1 Von der Probe bis zur Analyse mit den Mentype® **DigitalQuant** Assays

Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 16) sind mit FAM markiert, die aktive Referenz (REF) und die SRY Y-chromosomenspezifischen Marker werden über den HEX- Kanal (bzw. bei Nutzung des QuantStudio™ Systems VIC-Kanal) detektiert. Da alle verfügbaren Assays mit den gleichen Parametern durchgeführt werden, kann eine parallele Analyse von mehreren DIP-Markern in einem Analyseansatz erfolgen.

1.2 Plattform und Software

Die Testkits Mentype® **DigitalQuant** wurde mit dem Bio-Rad QX100™ und QX200™ Droplet Digital™ PCR System inklusive der Software Quanta™Soft (Version 1.7.4) und den folgenden Thermocyclern validiert:

- Applied Biosystem GeneAmp® PCR System 9700 Aluminium und GeneAmp® PCR System 9700 Silber
- Eppendorf Mastercycler ep-S und Mastercycler nexus
- Biometra T1
- Bio-Rad DNA Engine PTC-200.

Die Testkits Mentype® **DigitalQuant** wurden zur Verwendung auf der Plattform Thermo Fisher Scientific Inc. QuantStudio™ 3D Digital PCR bei Nutzung des Thermocyclers Thermo Fisher Scientific Inc. ProFlex™ 2x Flat PCR System verifiziert. Die Verifizierung wurde mit der Software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Software (V3.1, Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Die Anwendung und Durchführung des Mentype® **DigitalQuant** Kits auf diesen Geräten muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

Die Anwendung und Durchführen der Mentype® **DigitalQuant** Assays auf Instrumenten, die nicht oben erwähnt sind, liegt in der Verantwortung des Anwenders und muss selbst validiert werden.

2. Mitgelieferte Materialien

2.1 Kitinhalt

Die folgenden Reagenzien zur Durchführung der Mentype® **DigitalQuant** Kits sind im Lieferumfang enthalten:

Tabelle 1 Kitinhalt eines Mentype® **DigitalQuant** Kits (25 Reaktionen)

| Komponente | Reagenz | Anzahl Röhrchen | Vol./Röhrchen [µL] | Deckel- farbe | Lagerung |
|--------------------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|------------------|-------------------|
| Nuclease-Free Water | Nuklease-freies Wasser | 1 | 1.500 | Blau | -25 °C bis -15 °C |
| Primer Mix Mentype® DigitalQuant | Primermix | 1 | 63 | Rot | -25 °C bis -15 °C |

2.2 Bestellinformation

Bestellungen richten Sie bitte schriftlich an:

Email: sales@biotype.de

Fax: +49 (0)351 8838 403

Tabelle 2 Bestellinformation der Mentype® **DigitalQuant** Assays

| Produktname | Packungsgröße | Bestellnummer |
|------------------------------|---------------|----------------|
| Mentype® DigitalQuant | 25 Reaktionen | 45-02xx1*-0025 |

*"xx" definiert das entsprechende DIP des Mentype® **DigitalQuant** Assays.

Die spezifischen Bestellnummern der Mentype **DigitalQuant** Assays entnehmen Sie bitte Tabelle 18 und Tabelle 19, Seite 24-25.

3. Warn- und Sicherheitshinweise

3.1 Sicherheitshinweise

Bitte beachten Sie die Sicherheitsdatenblätter.

Für die Kitkomponenten sind die Sicherheitsdatenblätter auf Anfrage erhältlich. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

3.2 Qualitätskontrolle

Alle Kitkomponenten unterliegen dem intensiven Qualitätssicherungsprozess der Biotype GmbH. Die Qualität der Testkits wird permanent überwacht, um eine uneingeschränkte Verwendbarkeit zu gewährleisten. Bei Fragen zur Qualitätssicherung stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung (support@biotype.de).

3.3 Marken und Patente

Mentype® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype GmbH.

3.4 Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Lagern Sie die Testkits Mentype® **DigitalQuant** vor Licht geschützt bei -25 °C bis -15 °C und vermeiden Sie übermäßige Frier-Tau-Zyklen (10 Gefrier-Tau-Zyklen sollten nicht überschritten werden).

Das Haltbarkeitsdatum der Kits ist auf dem Außenetikett angegeben.

4. Durchführung Mentype® DigitalQuant – Allgemeine Informationen

4.1 Probenentnahme und -Handhabung

Dieser Test ist für die Verwendung von genomischer DNA, welche aus peripheren Blutproben sowie Knochenmark extrahiert wurde, vorgesehen. Die Nutzung anderer Proben (z. B. sortierte Zellen) muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

Die Probenahme kann über standardmäßig verwendete Blutentnahmeröhrchen stattfinden. Die Proben sollten nach der Entnahme gekühlt (4-8 °C) gelagert werden und so bald wie möglich zur DNA-Extraktion genutzt werden.

Zur gDNA-Extraktion sollten kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von genomischer DNA verwendet werden. Die folgenden Kits werden zur DNA-Extraktion empfohlen:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Bestell-Nr. 51104
- NucleoSpin Blood L Kit, Machery-Nagel, Bestell-Nr. 740954.20

Konzentrierte gDNA kann durch Verdünnung mit 1x TE-Puffer auf die benötigte Konzentration eingestellt werden. gDNA sollte bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.

4.2 Optional: Bestimmung des Allelstatus der informativen Loci

Falls der Allelstatus der informativen Loci nicht vorliegt, muss dieser vor der Berechnung der DNA-Anteile der Mischprobe bestimmt werden. Hierzu analysieren Sie die Ausgangsprobe mit dem entsprechenden informativen Mentype® **DigitalQuant** Marker. Es wird der Einsatz von **10-25 ng** DNA in die Reaktion empfohlen. Nach erfolgter Analyse der Ausgangsprobe wird der Allelstatus berechnet.

Wenn das prozentuale Verhältnis der Konzentration (Kopien)/µL im FAM-Kanal (AOI, Allele of Interest, DIP-Loci oder SRY) zu der Konzentration (Kopien)/µL im HEX- bzw. VIC-Kanal (REF) **weniger als 65 %** beträgt, ist das AOI im Marker heterozygot. Ist das Verhältnis **größer als 65 %**, so handelt es sich um einen homozygoten Marker. Die daraus resultierenden Berechnungsformeln entnehmen Sie im Folgenden den Tabelle 12 - Tabelle 15.

$$\text{Verhältnis in Prozent} = \frac{(100 * \text{conc}(\text{copies}/\mu\text{L}) \text{ AOI})}{\text{conc}(\text{copies}/\mu\text{L}) \text{ REF}}$$

4.3 Quantifizierungs-Protokoll

Generell wird die Quantifizierung mit Mentype® **DigitalQuant** durch das Verhältnis der Konzentration des informativen DIP-Locus (FAM, Konzentration (Kopien)/µL) zur Konzentration von REF oder SRY (HEX bzw. VIC Kanal, Konzentration (Kopien)/µL) innerhalb eines Duplex-Assays berechnet.

Hinweis: Für eine statistisch gesicherte und robuste DNA-Analyse wird die Analyse von mindestens 2 und optimal 3 informativen Loci empfohlen.

5. Durchführung bei Verwendung der Plattform QX100™/QX200™

5.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Folgende Reagenzien sind erforderlich, um die Mentype® **DigitalQuant** Assays auf der ddPCR Plattform QX100™/QX200™ auszuführen:

Tabelle 3 Zusätzlich benötigte Reagenzien für Mentype® **DigitalQuant**

| Reagenzien | Anbieter |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|
| ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) | Bio-Rad Laboratories |
| FastDigest <i>EcoRI</i> (z. B. Thermo Scientific™) | z. B. Fisher Scientific GmbH |
| DIP Positive Control (DPC) (Bestell-Nr: 00-10030-0100) | Biotype GmbH |

Tabelle 4 Standardreagenzien und Geräte des QX200™/QX100™ Systems

| Reagenzien und Geräte | Anbieter |
|-----------------------------------------------------|----------------------|
| QX100™/QX200™ Droplet Generator | Bio-Rad Laboratories |
| PX1 PCR Plate Sealer | Bio-Rad Laboratories |
| QX100™/QX200™ Droplet Digital™ PCR System | Bio-Rad Laboratories |
| Droplet Generation Oil for Probes | Bio-Rad Laboratories |
| ddPCR™ Droplet Reader Oil | Bio-Rad Laboratories |
| ddPCR™ Buffer Control for Probes | Bio-Rad Laboratories |
| DG8™ Cartridge Holder | Bio-Rad Laboratories |
| DG8™ Cartridges for QX200™/QX100™ Droplet Generator | Bio-Rad Laboratories |
| DG8™ Gaskets for QX200™/QX100™ Droplet Generator | Bio-Rad Laboratories |
| PCR Plate Heat Seal, foil, pierceable | Bio-Rad Laboratories |
| ddPCR™ 96-Well Plates | Bio-Rad Laboratories |
| 96-well PCR foil | beliebig |

5.2 Ansetzen des Mentype® **DigitalQuant** Mastermixes

Die nachstehende Tabelle 5 zeigt Volumen von Reagenzien für 5 µL Proben-gDNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µL. Die gDNA-Konzentration sollte 20 ng-60 ng in einem maximalen Volumen von 7,5 µL pro Assay betragen.

Die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit der Mentype® **DigitalQuant** -Analyse hängt von der Qualität und der Menge der eingesetzten gDNA ab. Der allelspezifische Primer-Mix ist für höchste Spezifität und Sensitivität (0,1 %) auf den Einsatz von **50 ng** gereinigter Gesamt-gDNA optimiert.

Tabelle 5 Ansatz einer Reaktion Mentype® **DigitalQuant** bei Nutzung von 5 µL gDNA

| Komponenten | Volumen pro Reaktion |
|------------------------------------------|----------------------|
| Nuclease-Free Water | 2,5 µL |
| 2 x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) | 10,0 µL |
| Mentype® DigitalQuant Primermix | 2,0 µL |
| FastDigest <i>EcoRI</i> Enzym | 0,5 µL |
| Volumen des Mastermixes | 15,0 µL |
| gDNA (10 ng/µL) | 5,0 µL |

Alle Komponenten sollten gemischt (vortexen) und vor dem Vorbereiten des Mastermix für ca. 10 s zentrifugiert werden.

Berücksichtigen Sie bei der Berechnung des erforderlichen Mastermix-Volumens die Anzahl der positiven und negativen Kontrollreaktionen. Fügen Sie ein oder zwei Reaktionen zu dieser Zahl hinzu, um Pipettierverluste zu kompensieren.

5.2.1. Positiv-Kontrolle (nicht im Kit enthalten)

Anstelle von DNA setzen Sie 5 µL der DIP Positive Control (5 ng/µL, Biotype GmbH) ein. Es wird empfohlen, für jeden Mentype® **DigitalQuant** Assay mindestens eine Positivkontrolle durchzuführen.

5.2.2. Negativ-Kontrolle

Nuklease-freies Wasser dient als negative Kontrolle (no template control). Anstelle der gDNA pipettieren Sie das entsprechende Volumen an nuklease-freiem Wasser. Es wird empfohlen, für jeden Mentype® **DigitalQuant** Assay mindestens eine Negativkontrolle durchzuführen.

5.3 Restriktionsverdau

Nach Ansetzen des Mastermixes und Zugabe der Proben-gDNA, verschließen Sie die PCR-Platte mit selbstklebender Folie (nicht im Kit enthalten) und vortexen sowie zentrifugieren Sie die Platte kurz. Für den Restriktionsverdau inkubieren Sie anschließend die Platte für **10 min bei 37 °C** im PCR-Gerät.

Hinweis: gDNA-Mengen von > 100 ng gDNA pro ddPCR-Ansatz müssen extra vor der PCR-Reaktion mit *EcoRI* verdaut werden. gDNA-Mengen bis zu 100 ng gDNA pro Well können direkt im PCR-Reaktionsansatz verdaut werden. Verwenden Sie hierzu das Standard-Protokoll des Enzyms zum DNA Verdau.

5.4 Ansetzen der Droplet Digital PCR - Tröpfchenerzeugung

Platzieren Sie die DG8-Cartridge in den Cartridge Holder. Pipettieren Sie jede Probe (20 µL des verdauten PCR-Gemisches) ca. 3-mal auf und ab, bevor Sie die Probe in die mittlere Reihe der DG8-Cartridge übertragen - beachten Sie die allgemeinen Richtlinien von Bio-Rad für die Tröpfchenerzeugung.

Beginnen Sie mit dem Pipettieren des verdauten PCR-Mixes. Übertragen Sie die Proben in der DG8-Cartridge von links nach rechts. Alle 8 Wells der DG8 Cartridge müssen entweder mit Probe oder mit 1x ddPCR™ Buffer Control for Probes (nicht im Kit enthalten) befüllt werden.

Nach Übertragung aller 8 Proben, füllen Sie 70 µL Droplet Generation (DG) Öl in die unterste Reihe der DG8-Cartridge. Alle 8 Öl-Wells der DG8 Cartridge müssen DG Öl enthalten.

Spannen Sie die Gasket über die DG8-Cartridge, indem Sie die Löcher auf beiden Seiten verwenden.

Hinweis: Nutzen Sie, um die DG8 Cartridge zu befüllen, stets die dafür vorgesehene Halterung. Das DG-Öl darf erst in die 8 Wells der DG8 Cartridge verteilen werden, wenn alle 8 Wells mit Probe befüllt wurden.

Platzieren Sie die gefüllte, noch immer im Cartridge Holder sitzende, DG8 Cartridge in das QX100™/QX200™ Droplet Generator Instrument.

Nach der Tröpfchenerzeugung enthält die obere Reihe der DG8 Cartridge die generierten Tröpfchenproben. Übertragen Sie 40 µL der Tröpfchenproben in eine ddPCR™ 96-Well Plate.

Tipp: Verwenden Sie eine 8-Kanal-Pipette um Zeit zu sparen.

Pipettieren Sie weitere Proben in jeweils neue Cartridges.

Hinweis: Handhaben Sie die Proben nach der Tröpfchenbildung vorsichtig (kein vortexen, kein zentrifugieren). Starten Sie sofort, jedoch maximal 2 Stunden nach Abschluss der ersten Tröpfchengenerierung die PCR Amplifikation.

Zum Versiegeln der 96-well Platte legen Sie eine durchbohrbare Alu-Folie (Pierceable Foil Heat Seal) auf die Platte und verschweißen diese im PX1 Plate Sealer. Beachten Sie hierbei auch die Bio-Rad Bedienungsanleitung für den PX1 PCR Plate Sealer (Bulletin 10023997).

5.5 Digital PCR Amplifikation

Wenn die Heißversiegelung abgeschlossen ist, stellen Sie die 96-well PCR-Platte in einen Thermocycler und starten Sie das Programm gemäß Tabelle 6.

Hinweis: Platte nicht vortexen und nicht zentrifugieren!

Tabelle 6 Amplifikationsparameter des Mentype® DigitalQuant*

| Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl | Heiz- und Kühlrate** |
|------------|--------|--------------|----------------------|
| 95 °C | 10 min | 1x | |
| 94 °C | 30 s | 40x | 2 °C/s |
| 62 °C | 60 s | | |
| 98 °C | 10 min | 1x | |
| 4 °C | ∞ | 1x | 1 °C/s |

* Beheizen Sie den Deckel indem Sie die Temperatur auf 105 °C einstellen. Stellen Sie das Probenvolumen auf 40 µL ein.

** Die Einstellung der Heiz- und Kühlrate ist abhängig von dem Blockmaterial des PCR-Instruments:

- > Für PCR-Cycler mit **Aluminium-Block** verwenden Sie eine Heiz- und Kühlrate von **2 °C/s**.
- > Für PCR-Cycler mit **Silberblock** verwenden Sie **1 °C/s**;
- > Wenn Sie das **Blockmaterial nicht bestimmen können**, verwenden Sie **1 °C/s**.

5.6 Auslesen der Tröpfchen und Analysieren der Ergebnisse

Nachdem die Amplifikation beendet ist, geben Sie die PCR-Platte mit den Proben-Tröpfchen in den Halter des QX100™/QX200™ Droplet Digital™ PCR Systems (Tröpfchenlesers).

Hinweis: Platte nicht vortexen und nicht zentrifugieren!

5.6.1. Erstellen des Platten-Layouts

Öffnen Sie die Software Quanta™Soft von Bio-Rad. Erstellen Sie das Platten-Layout für Ihr Experiment entsprechend Ihrem Probenschema. Öffnen Sie den Editor (Applied Well Settings) durch Doppelklick auf ein Well im Plattenlayout. Vergeben Sie den Proben-Namen, die Art des Experiments und legen Sie fest, welches Assay welchem Fluoreszenz-Kanal entspricht.

Für die Analyse des Mentype® **DigitalQuant** Assays nutzen Sie die in Tabelle 7 aufgeführten Einstellungen:

Tabelle 7 Festzulegende Einstellungen zur Analyse des Mentype® **DigitalQuant** Kits in der Software Quanta™Soft

| Proben und Experiment Optionen | Einstellung |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Sample | |
| Name | vergeben Sie einen Probenamen |
| Experiment | Absolute Quantification (ABS) |
| Supermix | ddPCR™ Supermix for Probes (no dUTP) |
| Target 1 | |
| Name | Marker Name z. B. DP67 |
| Type | z. B. Ch 1 Unknown |
| Target 2 | |
| Name | REF oder SRY |
| Type | z. B. Ch 2 Unknown |

Hinweis: Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 16) sind mit FAM markiert. Die Referenz (REF) bzw. SRY ist entsprechend mit HEX markiert.

Nach Erstellung des Platten-Layouts starten Sie durch Klicken auf **Run**.

Der Tröpfchenleser zählt fluoreszenz-positive und -negative Tröpfchen für die absolute Quantifizierung der Ziel-DNA. Jedes probenenthaltende Tröpfchen wird sowohl für die FAM- als auch die HEX-Fluoreszenz individuell verarbeitet und verifiziert. Für die Konzentrationsberechnungen werden nur Daten von Proben verwendet, wenn **mindestens 10.000** akzeptierten Tröpfchen analysiert wurden. Diesen Wert finden Sie in der Datentabelle **Table** der Software Quanta™Soft, Spalte **AcceptedDroplets**, oder in der Ansicht **Events**, bezeichnet als **total**.

5.6.2. Datenanalyse

Laden Sie die Platte in das Setup-Fenster der Quanta™Soft Software (Bio-Rad). Klicken Sie auf **Analyze**, um die Daten zu öffnen und die automatische Analyse der Software zu starten. Überprüfen Sie die Daten im 2D Amplitude-Kanal, um sicherzustellen, dass die automatisierte Cluster-Trennung korrekt ist (siehe Abbildung 2).

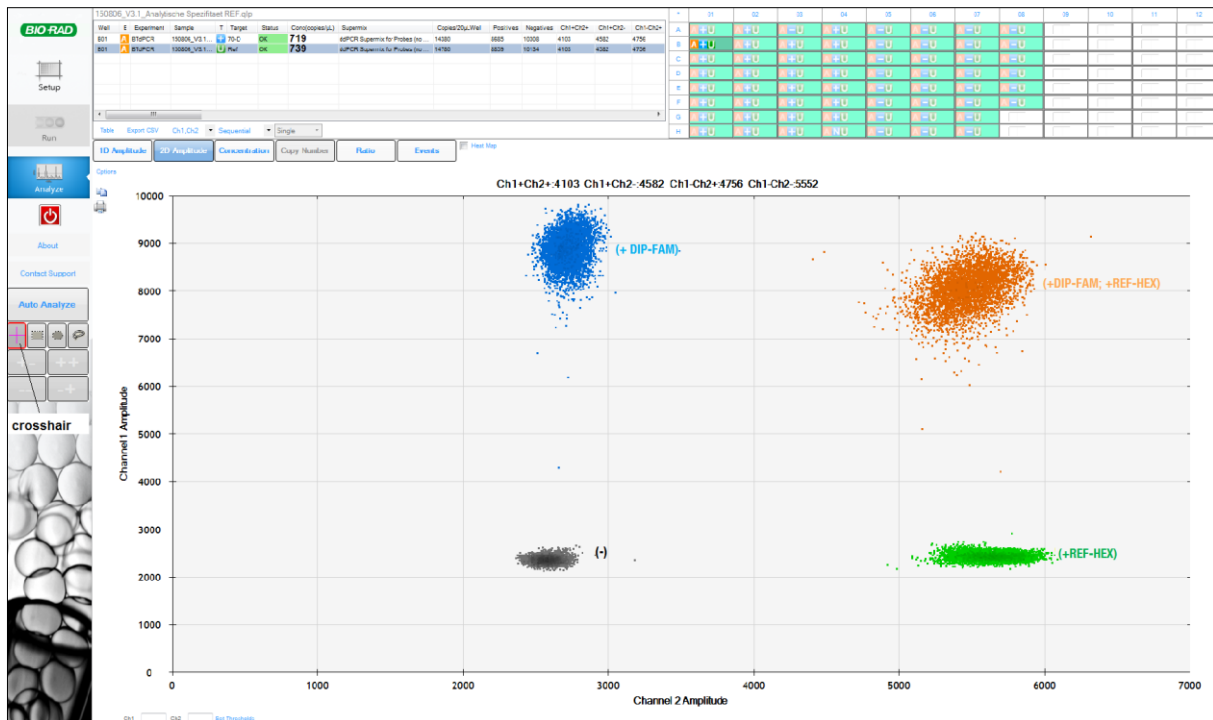


Abbildung 2 Ansicht 2D-Amplitude (Scatter Blot) der Tröpfchenfluoreszenz

Alle 4 Cluster (grau, grün, orange, blau) müssen vollständig getrennt sein (siehe Abbildung 2). Wenn Cluster nicht korrekt getrennt sind, müssen manuell Korrekturen vorgenommen werden. Verwenden Sie hierzu die links am Bildschirmrand angezeigten Tools (z. B. „crosshair“, Fadenkreuz).

Die Tröpfchen interpretieren Sie wie folgt: doppelt negativ (grau), FAM positiv (blau), HEX positiv (grün) und doppelt positiv (orange - positiv für FAM und HEX im selben Tröpfchen).

Die manuelle Korrektur war erfolgreich, wenn sich die Farbe des Clusters bzw. einzelner Tröpfchen ändert (bei Nutzung des Fadenkreuzes muss dieses in rosa angezeigt werden).

Wählen Sie anschließend die zu analysierenden Wells aus und klicken Sie auf **Table**. Öffnen Sie anschließend die **Result Table** um die Ergebnisse einzusehen.

5.7 Mindestanforderungen an Dropletdaten vor der Berechnung

Bevor der Anteil der Mischprobe berechnet wird, sollten die Daten hinsichtlich ihrer Qualität überprüft werden.

- Pro Probe sollten mindestens 10.000 Droplets erkannt und analysiert werden.
- Das Detektionslimit für ein erfolgreich durchgeführtes Experiment liegt bei fünf FAM-positiven Tröpfchen. Hierbei kann die Amplifikation im FAM-Kanal alleine (blaues Cluster) sowie im FAM- und HEX-positiven Cluster (orangenes Cluster) vorliegen. Ein Ergebnis mit weniger als fünf Tröpfchen wird als negativ definiert.

6. Durchführung bei Verwendung der Plattform QuantStudio™ 3D

6.1 Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Folgende Reagenzien sind erforderlich, um die Mentype® **DigitalQuant** Assays auf der Plattform QuantStudio™ 3D auszuführen:

Tabelle 8 Zusätzlich benötigte Reagenzien für Mentype® **DigitalQuant**

| Reagenzien | Anbieter |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------|
| QuantStudio™ 3D Digital PCR Mastermix v2 | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| DIP Positive Control (DPC) (Bestell-Nr: 00-10030-0100) | Biotype GmbH |

Tabelle 9 Standardreagenzien und Geräte des QuantStudio™ 3D Systems

| Reagenzien und Geräte | Anbieter |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| QuantStudio™ 3D DigitalPCR Chip Kit v2 | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument with Power Cord | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Adapter Kit for Flat Block Thermal Cycler | Thermo Fisher Scientific Inc. |
| ProFlex™ 2x Flat PCR System | Thermo Fisher Scientific Inc. |

6.2 Ansetzen des Mentype® **DigitalQuant** Mastermixes

Die nachstehende Tabelle 10 zeigt die Volumina der benötigten Reagenzien für 5 µL Proben-DNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 14,5 µL. Die DNA-Konzentration sollte **50-60 ng** in einem maximalen Volumen von 8,7 µL pro Reaktion betragen.

Die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit der Analyse mit Mentype® **DigitalQuant** hängt von der Qualität und der Menge der eingesetzten DNA ab. Der allelspezifische Primermix ist für höchste Spezifität und Sensitivität (0,1 %) auf den Einsatz von **50 ng** gereinigter Gesamt-DNA optimiert.

Hinweis: DNA-Mengen von > 100 ng DNA pro dPCR-Ansatz sollten extra vor der PCR-Reaktion mit EcoRI verdaut werden.

Berücksichtigen Sie bei der Berechnung des erforderlichen Mastermix-Volumens die Anzahl der positiven und negativen Kontrollreaktionen. Fügen Sie ein oder zwei Reaktionen zu dieser Zahl hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Tabelle 10 Mastermix Ansatz für Mentype® **DigitalQuant** bei Nutzung von 5 µL DNA

| Komponenten | Volumen pro Well (Einfachbestimmung) |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| Nuclease-Free Water | 3,7 µL |
| QuantStudio™ 3D MasterMix v2 | 4,3 µL |
| Mentype® DigitalQuant 10 x Primer Mix | 1,5 µL |
| Volumen des Mastermixes | 9,5 µL |
| gDNA (10 ng/µL) | 5,0 µL |

Alle Komponenten sollten vor dem Vorbereiten des Mastermix gemischt (vortexen) und für ca. 10 s zentrifugiert werden.

Hinweis: Bereiten Sie für alle Proben den Reaktionsansatz komplett vor. Eine Zugabe von Mentype® **DigitalQuant** Primermix oder gDNA während der Beladung der Chips ist nicht möglich.

6.2.1. Positiv-Kontrolle (nicht im Kit enthalten)

Anstelle von DNA setzen Sie 5 µL der DIP Positive Control (5 ng/µL, Biotype GmbH) ein. Es wird empfohlen, für jeden verwendeten Mentype® **DigitalQuant** Assay mindestens eine Positivkontrolle durchzuführen.

6.2.2. Negativ-Kontrolle

Nuklease-freies Wasser dient als negative Kontrolle (no template control). Anstelle der DNA, pipettieren Sie das entsprechende Volumen an nuklease-freiem Wasser zum Reaktionsansatz. Es wird empfohlen, für jeden verwendeten Mentype® **DigitalQuant** Assay eine Negativkontrolle durchzuführen.

6.3 Beladen der QuantStudio™ 3D Chips

Detaillierte Informationen zur Beladung der QuantStudio™ 3D Chips können Sie der Gebrauchsanweisung des Herstellers entnehmen.

- Schalten Sie den QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader an und warten Sie, bis das Gerät betriebsbereit ist (LED leuchtet durchgängig grün).
- Legen Sie die benötigten Verbrauchsmaterialien QuantStudio™ 3D Chip Kit v2 (Chips, Lids, Blades, Immersionsölspritzen inkl. Spitzen) sowie die benötigten Labormaterialien bereit.
- Entnehmen Sie den Chip aus der Umverpackung. Achten Sie darauf, das schwarze Beladungsfeld des Chips nicht berühren.
- Spannen Sie den Chip in die vorgesehene Position des QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader ein.
- Entnehmen Sie den Chipdeckel (Lid) der Umverpackung, achten Sie darauf, die Glasfläche des Deckels nicht berühren.
- Entfernen Sie die Schutzfolie von der umlaufenden Klebefläche und spannen Sie den Deckel in die vorgesehene Position des QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader ein.
- Entnehmen Sie eine Ladeklinge der Umverpackung und spannen Sie diese ebenfalls an die vorgesehene Position des QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader ein.
- Entnehmen Sie mit einer Pipette 14,5 µL des vorbereiteten Reaktionsansatzes und pipettieren Sie diesen in das Probenreservoir (Sample Loading Port) der Beladeklinge.
- Achten Sie darauf, dass der Reaktionsansatz ohne Bläschen und gleichmäßig verteilt in das Probenreservoir einpipettiert wird.
- Drücken Sie das Tastfeld des QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader, um die Beladung des Chips zu starten.
- Entnehmen Sie während dessen eine Spritze mit Immersionsöl, öffnen Sie diese und setzen Sie die Spitze auf die Spritze.
- Verwerfen Sie die ersten Tropfen Immersionsöl.
- Sobald die Beladung des Chips abgeschlossen ist (die Beladungsklinge steht nicht mehr im Kontakt zum Chip) benetzen Sie die schwarze Chipfläche vollständig mit Immersionsöl.
- Legen Sie den Arm des QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader um, um den Chip mit dem Deckel zu verkleben. Drücken Sie den Arm ca. 20-30 s auf den Chip.
- Entnehmen Sie den verschlossenen Chip dem QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader und halten Sie mit einer Hand die noch nicht verklebte Fläche zwischen Chip und Deckel offen (untere linke Ecke des Chips).
- Befüllen Sie den Chip vollständig mit Immersionsöl.
- Beachten Sie, dass der Chip vollständig befüllt ist, das Immersionsöl jedoch nicht überläuft.

- Entfernen Sie anschließend den restlichen Schutzstreifen vom Deckel und versiegeln Sie den Chip manuell.
- Lagern Sie den Chip waagrecht im Dunkeln während weitere Chips beladen werden.

Starten Sie sofort, jedoch maximal 2 Stunden nach Abschluss der Beladung der Chips, die PCR.

6.4 Amplifikationsparameter

Nach Befüllung und Versiegelung aller QuantStudio™ 3D Chips muss unverzüglich die PCR durchgeführt werden. Legen Sie hierzu die beladenen Chips in den PCR Cycler. Achten Sie darauf, dass der Schriftzug der Chips für Sie lesbar ist (QR-Code in Richtung Display, Schriftzug in Richtung Deckel des Gerätes). Bedecken Sie die Chips mit den QuantStudio™ Thermal Pads und schließen Sie den Cycler. Die Amplifikationsparameter entnehmen Sie der folgenden Tabelle 11:

Tabelle 11 Amplifikationsparameter zur Durchführung der Mentype® DigitalQuant Assays

| Temperatur | Zeit | Zyklusanzahl | Rampingrate |
|------------|--------|--------------|-------------|
| 95 °C | 10 min | 1 x | 1 °C/s |
| 94 °C | 30 s | 40 x | |
| 55 °C | 60 s | | |
| 98 °C | 10 min | 1 x | |
| 10 °C | ∞ | 1 x | |

Beachten Sie, dass der Deckel mit 70 °C beheizt wird und das Probenvolumen auf 1 nL justiert ist.

6.5 Auslesen der QuantStudio™ 3D Chips

Nach Ende der PCR können die Chips ausgelesen werden. Um mögliche Kondensationstropfen auf dem Chip zu minimieren, sollten die Chips ca. 20-30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln trocken lagern. Eventuell trotzdem vorhandene Kondensationströpfchen können mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig in eine Richtung wischend entfernt werden. Die Chips sollten innerhalb von 24 h nach Ende der PCR ausgelesen werden.

Schalten Sie das QuantStudio™ 3D Gerät ein, öffnen Sie die Schublade und legen Sie einen Chip in die vorgesehene Aussparung. Schließen Sie die Schublade. Das Gerät prozessiert und analysiert den Chip. Während der Analyse eines Chips kann bereits der nächste Chip ausgelesen werden.

Nach Abschluss der Analyse können die Chips bei Raumtemperatur, flach liegend, trocken und dunkel gelagert werden. Eine wiederholte Analyse der Chips ist möglich, jedoch ist ein Fluoreszenzverlust während der Lagerung möglich.

Hinweis: Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 16) sind mit FAM markiert; in der SRY+REF Kombination ist SRY mit FAM markiert. Der REF Marker wird immer im VIC Kanal detektiert.

6.6 Analyse der Rohdaten

Die erhobenen Daten werden mit einer Cloud-Software von Thermo Fisher Scientific Inc. analysiert. Die Software analysiert die Anzahl der positiven und negativen Kavitäten für jedes Fluorophor der Probe. Die Bestimmung der Ausgangskonzentration der Ziel-DNA wird mittels Poisson-Algorithmus über die Software bestimmt (Konzentration der Kopien/ μ L).

Sie finden die Software QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Software V3.1 im zugangsgeschützten Bereich der Thermo Fisher Homepage unter <https://www.thermofisher.com/myssso/loginDisplay>. Wählen Sie im Dashboard die App

AnalysisSuite dPCR aus. In der sich öffnenden Ansicht, sind alle bereits erstellten Projekte aufgelistet. Zur besseren Übersicht sollte je Experiment ein Projekt erstellt werden.

6.6.1. Software Vorbereitung

Neues Projekt erstellen

Klicken Sie zum Erstellen eines neuen Projektes im rechten unteren Bereich des Fensters auf **Create Project**, benennen Sie das neue Projekt anschließend eindeutig.

Daten Importieren

Im neu erstellten Projekt werden Sie automatisch zur Registerkarte **Import Data** geleitet. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Import from local source**, wenn der Rechner nicht direkt mit dem QuantaSoft™ 3D Digital PCR Instrument verbunden ist. Besteht eine Verbindung zwischen Rechner und QuantaSoft™ 3D Digital PCR Instrument, können Sie über die Schaltfläche **Import chip(s)** die Daten importieren. Wählen Sie den Speicherort der Daten aus und importieren Sie diese.

Registerkarte Define Chips

In der Registerkarte **Define Chips** können Sie die Rohdaten editieren. Es besteht die Möglichkeit den Probenamen oder einer Probennummer in der Spalte **Sample** zu vergeben. Zudem kann in der Spalte **Task** eine spezielle Eigenschaft, z. B. No Template Control, hinterlegt werden.

Achten Sie darauf, dass die Voreinstellungen in den Spalten **Rare Dye (FAM)**, **Target (VIC)**, **Target (FAM)** den Spezifikationen des Assays entsprechen.

6.6.2. Ansicht der Daten

Wechseln Sie zur Registerkarte **Review Data**, um die Visualisierung der Rohdaten einzusehen und gegebenenfalls anzupassen.

Wählen Sie zunächst in der Übersicht im linken Bereich den gewünschten Chip durch Anklicken aus. Mit einem Doppelklick auf den entsprechenden Chip können Sie die Detailansicht öffnen (Abbildung 3). Diese Ansicht enthält die Chipnummer, den Probenamen, den Assaynamen sowie den Task. In der Detailansicht des Chips können Sie die Bewertung jedes einzelnen Kompartimentes einsehen. Gehen Sie hierfür mit dem Mauszeiger über die gewünschte Stelle in der Chipansicht.

Die Detailansicht enthält zudem die Anzahl an befüllten Kavitäten (16.616 in Abbildung 3) sowie die Anzahl an ausgewerteten Kavitäten (14.434 in Abbildung 3). Die Kavitäten werden über einen internen Qualitätsfaktor bewertet und entsprechend zur Auswertung genutzt. Für genauere Informationen hierzu kontaktieren Sie bitte den Support von Thermo Fisher Scientific.

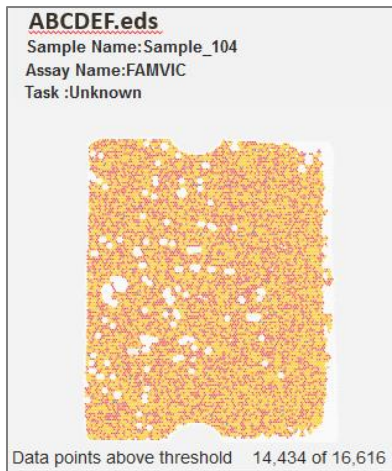



Abbildung 3 Detailansicht eines Chips

Im rechten Bereich des Fensters öffnet sich die **2D Ansicht** des Chips (Abbildung 4), diese lässt sich jederzeit über die Schaltfläche  öffnen. In dieser Ansicht werden die Ergebnisse des FAM-Kanals mit denen des VIC-Kanals kombiniert. Ein Punkt in dieser Ansicht entspricht einem ausgewerteten Kompartiment.

- Gelbe Punkte zeigen keine Amplifikation von Targets mit FAM- und VIC-spezifischen Primern, die Kavitäten sind negativ.
- Blaue Punkte beinhalten eine Amplifikation im FAM-Kanal, jedoch nicht im VIC-Kanal; hier wurde nur der verwendete DIP-Loci amplifiziert.
- Rote Punkte beinhalten eine Amplifikation im VIC-Kanal, jedoch nicht im FAM-Kanal; hier wurde nur der REF- bzw. SRY-Loci amplifiziert.
- Grüne Punkte deuten auf eine Amplifikation des FAM und VIC-Kanales hin; es wurden also beide Targets für den DIP-Loci sowie den REF- bzw. SRY-Loci amplifiziert.

Im oberen Bereich der Ansicht wird die absolute Anzahl an detektierten Kavitäten je Cluster angezeigt.

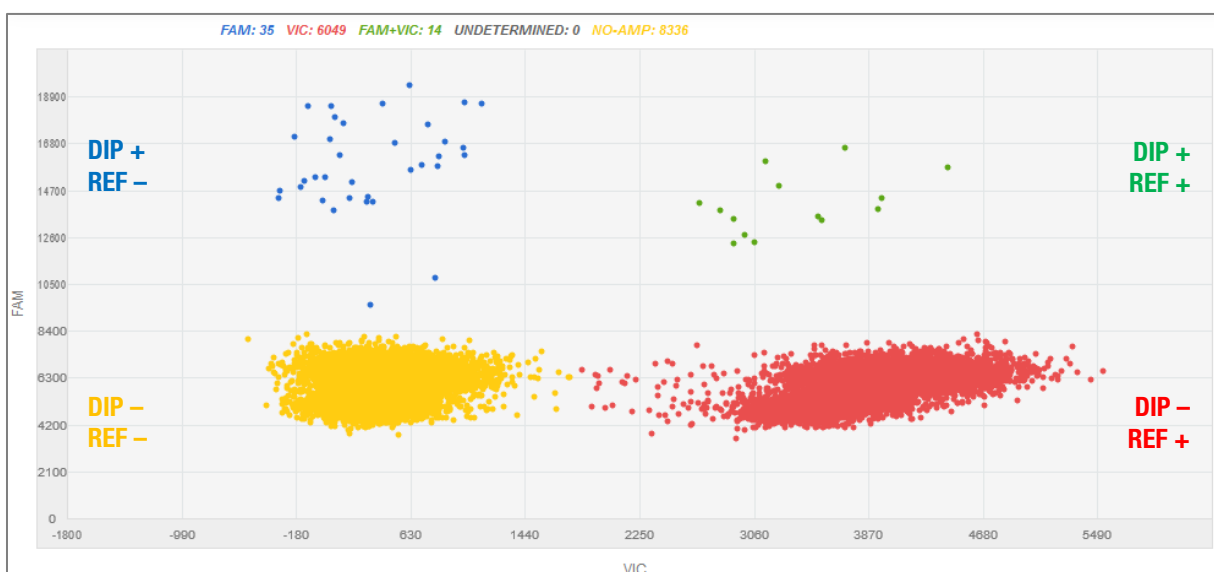



Abbildung 4 2D Ansicht eines Chips mit negativen Kompartimenten (gelb), FAM-positiven Kompartimenten (blau), VIC-positiven Kompartimenten (rot) sowie FAM- und VIC-positiven Kompartimenten (grün)

Eine weitere hilfreiche Ansicht ist die **1D bzw. Histogramm-Ansicht** der einzelnen Farbkanäle (Abbildung).

Klicken Sie auf die Schaltfläche  um zur Histogramm-Ansicht zu wechseln. Öffnen Sie das Histogramm des entsprechenden Kanals.

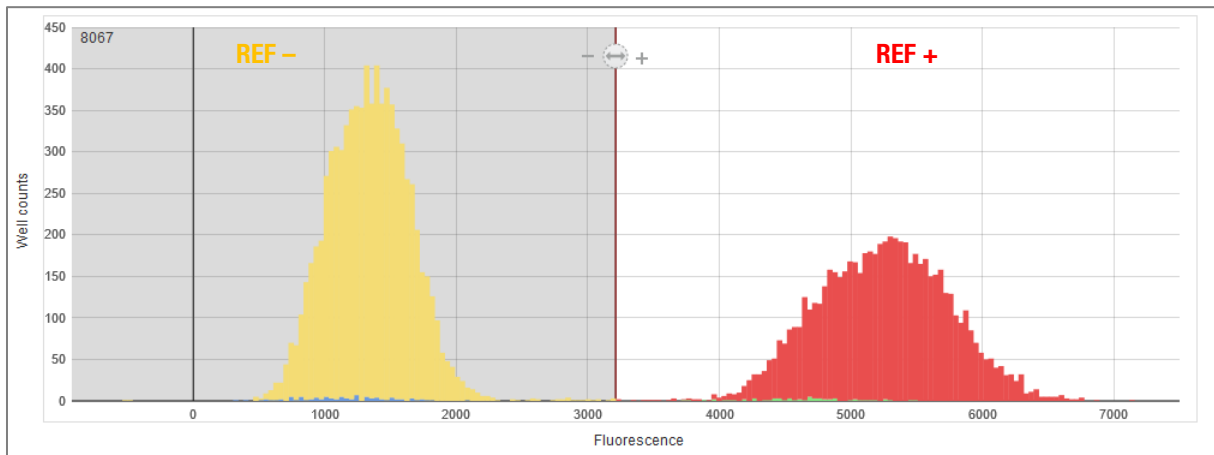



Abbildung 5 1D- bzw. Histogramm-Ansicht des VIC-Kanales eines Chips, der Balken zwischen den Maxima der Well Counts kann zur manuellen Anpassung des Threshold verschoben werden

Sowohl in der 1D als auch in der 2D Ansicht lassen sich die Skalen der Diagramme über die Schaltfläche  anpassen und festlegen.

6.6.3. Anpassung der Daten

Die Auftrennung der Cluster muss gegebenenfalls angepasst werden. Dies kann in der 1D oder 2D Ansicht der Daten erfolgen. Jeder Chip sollte auf eine möglicherweise notwendige Anpassung kontrolliert werden.

Verschieben Sie in der **1D Ansicht** den Threshold-Balken (Abbildung 5) in der Grafik oder passen Sie den Threshold im entsprechenden Fenster auf der rechten Seite an.

Nutzen Sie in der **2D Ansicht** die rechts befindlichen Werkzeuge, um Datenpunkte bestimmten Clustern zuzuordnen.

6.6.4. Export der Daten

Nach erfolgter Anpassung der Rohdaten wechseln Sie zum Export der Daten als .csv-Datei in die Registerkarte **Export**. Exportieren Sie Ihre **Project data as CSV** und klicken Sie auf **Export**. Speichern Sie die Datei ab. Verwenden Sie die angegebenen Konzentrationen Copies/ μ L (VIC) bzw. Copies/ μ L (FAM) zur Berechnung der DNA-Anteile.

6.7 Mindestanforderungen an Chipdaten vor der Berechnung

Bevor der Anteil der Mischprobe berechnet wird, sollten die Daten hinsichtlich ihrer Qualität überprüft werden.

- Es sollten mindestens 10.000 Kompartimente in der Auswertung eingeflossen sein, das Verhältnis von ausgewerteten Kavitäten zu gefüllten Kavitäten sollte über 70 % liegen.
- Es sollten mindesten 5 positive Kompartimente im FAM-Kanal vorhanden sein, um eine positive Amplifikation nachzuweisen. Hierbei kann die Amplifikation im FAM-Kanal alleine (blaues Cluster) sowie im FAM- und VIC-positiven Cluster (grünes Cluster) vorliegen. Proben mit weniger als 5 positiven Kavitäten im FAM Kanal sind als negativ zu werten.
- Die Chips sollten gleichmäßig mit Probe beladen sein, es sollten keine Luftblasen auf dem Chip erkennbar sein (vergleichen Sie hierzu auch mit dem Abschnitt Troubleshooting im Handbuch des Plattformanbieters Thermo Fisher Scientific Inc.).

Diese Werte können Sie der exportierten Daten-Tabelle im Abschnitt **Replicates** entnehmen oder im 2D Cluster (Abbildung 4) und der Detailansicht der Chips (Abbildung 3) einsehen.

Beispiel

Anhand der Probe aus Abbildung 3 und Abbildung 4 kann man die Datenqualität wie folgt beurteilen:

Es wurden 16.616 Kavitäten befüllt, 14.434 Kavitäten wurden ausgewertet. Die absolute Anzahl an ausgewerteten Kavitäten $14.434 > 10.000$, die Beladung des Chips ist valide.

Das Verhältnis aus ausgewerteten und gefüllten Kavitäten beträgt $14.434/16.616 = 0,87 = 87\%$, auch dieser Wert ist valide.

Es wurden insgesamt 35 positive Kavitäten im FAM-Kanal sowie 14 positive Kavitäten im FAM+VIC-Kanal detektiert, auch hier liegen die Werte über der Grenze von 5 positiven Amplifikationen.

Der Chip wurde gleichmäßig beladen, es sind keine Anomalien erkennbar. Die Probe kann folglich ausgewertet werden.

7. Berechnung der absoluten DNA-Anteile

Berechnen Sie das Verhältnis (Konzentration (Kopien)/ μL) des DIP-Lokus (AOI) zur Referenz (REF) oder dem SRY Lokus. Beachten Sie hierbei, ob es sich um einen homozygoten oder heterozygoten Marker handelt.

Vorsicht! Marker **307-I + REF** befindet sich auf dem X-Chromosom. Dieser Marker muss in gemischtgeschlechtlichen Mischproben als heterozygot behandelt werden. Die Kombination **307-I + SRY** berechnen Sie wie in Tabelle 15 gezeigt.

Tabelle 12 Berechnung der DIP+REF Kombination: homozygoten AOI

| Probe | AOI | REF | Formel | Prozent |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------|
| | conc(copies)/ μL | conc(copies)/ μL | | |
| Mischprobe | 338 | 644 | $= (100 \cdot \text{AOI}) / (\text{REF})$ $= (100 \cdot 338) / 644$ | 52,5 % |

Tabelle 13 Berechnung der DIP+REF sowie SRY+REF Kombination: heterozygoten AOI

| Probe | AOI | REF | Formel | Prozent |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| | conc(copies)/ μL | conc(copies)/ μL | | |
| Mischprobe | 162 | 611 | $= (100 \cdot 2 \cdot \text{AOI}) / (\text{REF})$ $= (100 \cdot 2 \cdot 162) / 611$ | 53,0 % |

Tabelle 14 Berechnung der DIP+SRY Kombination: homozygoten AOI

| Probe | AOI | SRY | Formel | Prozent |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| | conc(copies)/ μL | conc(copies)/ μL | | |
| Mischprobe | 337 | 182 | $= (100 \cdot \text{AOI}) / (\text{AOI} + 2 \cdot \text{SRY})$ $= (100 \cdot 337) / (337 + 2 \cdot 182)$ | 48,1 % |

Tabelle 15 Berechnung der DIP+SRY Kombination: heterozygoten AOI

| Probe | AOI | SRY | Formel | Prozent |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| | conc(copies)/ μL | conc(copies)/ μL | | |
| Mischprobe | 553 | 506 | $= (100 \cdot \text{AOI}) / (\text{AOI} + \text{SRY})$ $= (100 \cdot 553) / (553 + 506)$ | 52,2 % |

8. Verfügbarkeit und Charakteristik der Mentype® DigitalQuant Assays

Tabelle 16 Allele-spezifische Mentype® DigitalQuant Assays

| Loci | Deletion (- Allel) | Insertion (+ Allel) | Allele-spezifische Duplex- Assay mit Aktiver Referenz (REF) | Allele-spezifische Duplex-Assay mit Markern für die Y-chromosomale Region (SRY) |
|------|-----------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 67 | 67-D | | DP67-D+REF | DP67-D+SRY |
| 70 | 70-D | | DP70-D+REF | DP70-D+SRY |
| | | 70-I | DP70-I+REF | DP70-I+SRY |
| 88 | 88-D | | DP88-D+REF | DP88-D+SRY |
| | | 88-I | DP88-I+REF | DP88-I+SRY |
| 97 | | 97-I | DP97-I+REF | DP97-I+SRY |
| 101 | 101-D | | DP101-D+REF | DP101-D+SRY |
| | | 101-I | DP101-I+REF | DP101-I+SRY |
| 104 | 104-D | | DP104-D+REF | DP104-D+SRY |
| | | 104-I | DP104-I+REF | DP104-I+SRY |
| 105 | 105-D | | DP105-D+REF | DP105-D+SRY |
| | | 105-I | DP105-I+REF | DP105-I+SRY |
| 106 | | 106-I | DP106-I+REF | DP106-I+SRY |
| 114 | 114-D | | DP114-D+REF | DP114-D+SRY |
| | | 114-I | DP114-I+REF | DP114-I+SRY |
| 128 | 128-D | | DP128-D+REF | DP128-D+SRY |
| 131 | | 131-I | DP131-I+REF | DP131-I+SRY |
| 133 | | 133-I | DP133-I+REF | DP133-I+SRY |
| 134 | | 134-I | DP134-I+REF | DP134-I+SRY |
| 140 | | 140-I | DP140-I+REF | DP140-I+SRY |
| 152 | 152-D | | DP152-D+REF | DP152-D+SRY |
| 163 | 163-D | | DP163-D+REF | DP163-D+SRY |
| | | 163-I | DP163-I+REF | DP163-I+SRY |
| 301 | 301-D | | DP301-D+REF | DP301-D+SRY |
| | | 301-I | DP301-I+REF | DP301-I+SRY |
| 304 | 304-D | | DP304-D+REF | DP304-D+SRY |
| | | 304-I | DP304-I+REF | DP304-I+SRY |
| 307 | | 307-I | DP307-I+REF | DP307-I+SRY |
| 310 | | 310-I | DP310-I+REF | DP310-I+SRY |
| SRY | | SRY | DPSRY+REF | |

Tabelle 17 Locus-spezifische Information und chromosomale Lokalisation

| Locus | Chromosomale Lokalisation | Locus | Chromosomale Lokalisation |
|-------|------------------------------|-------|------------------------------|
| 67 | 5q33.3 | 133 | 3p22.1 |
| 70 | 6q16.1 | 134 | 5q11.2 |
| 88 | 9q22.33 | 140 | 3q23 |
| 97 | 13q13.1 | 152 | 16p13.2 |
| 101 | 15q26.1 | 163 | 12q24.31 |
| 104 | 13q32.1 | 301 | 17q21.32 |
| 105 | 14q24.3 | 304 | 9q34.3 |
| 106 | 16q13 | 307 | Xp11.23 |
| 114 | 17p13.2 | 310 | 2p22.3 |
| 128 | 1q31.3 | SRY | Yp11.2 |
| 131 | 7q36.2 | | |

9. Referenzen

Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E. (2002) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.

Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9236-9241.

George D, Czech J, John B, Yu M, Jennings LJ (2013) Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism*, 4:102-108.

Manoj P (2014) Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. *Mitochondrial DNA* 2014, e-published ahead of print [doi: 10.3109/19401736.2014.913168].

Jim F. Huggett, Carole A. Foy, Vladimir Benes, Kerry Emslie, Jeremy A. Garson, Ross Haynes, Jan Hellemans, Mikael Kubista, Reinhold D. Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, Carl T. Wittwer, and Stephen A. Bustin (2013) Guidelines for Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2013.206375.

10. Technische Unterstützung

Bei spezifischen Fragen zum Produkt oder für technische Unterstützung kontaktieren Sie bitte den Technischen Support unter:

Email: support@biotype.de

Telefon: +49 (0) 351 8838 400

11. Bestelldetails der Mentype® DigitalQuant Assays

Bestellungen richten Sie bitte schriftlich an:

Email: sales@biotype.de

Fax: +49 (0)351 8838 403

Tabelle 18 Bestellinformationen der allel-spezifischen Mentype® DigitalQuant Assays – diese Assays stehen Ihnen zu jeder Zeit zur Verfügung (Lagerhaltung)

| Assay | 25 Reaktionen |
|-------------|---------------|
| DP67-D+REF | 45-02011-0025 |
| DP70-D+REF | 45-02021-0025 |
| DP70-I+REF | 45-02031-0025 |
| DP88-D+REF | 45-02041-0025 |
| DP88-I+REF | 45-02051-0025 |
| DP97-I+REF | 45-02061-0025 |
| DP101-D+REF | 45-02071-0025 |
| DP101-I+REF | 45-02081-0025 |
| DP104-D+REF | 45-02091-0025 |
| DP104-I+REF | 45-02101-0025 |
| DP105-D+REF | 45-02111-0025 |
| DP105-I+REF | 45-02121-0025 |
| DP106-I+REF | 45-02131-0025 |
| DP114-D+REF | 45-02141-0025 |
| DP114-I+REF | 45-02151-0025 |
| DP128-D+REF | 45-02161-0025 |
| DP131-I+REF | 45-02171-0025 |
| DP133-I+REF | 45-02181-0025 |
| DP134-I+REF | 45-02191-0025 |
| DP140-I+REF | 45-02201-0025 |
| DP152-D+REF | 45-02211-0025 |
| DP163-D+REF | 45-02221-0025 |
| DP163-I+REF | 45-02231-0025 |
| DP301-D+REF | 45-02241-0025 |
| DP301-I+REF | 45-02251-0025 |
| DP304-D+REF | 45-02261-0025 |
| DP304-I+REF | 45-02271-0025 |
| DP307-I+REF | 45-02281-0025 |
| DP310-I+REF | 45-02291-0025 |
| DPSRY+REF | 45-02301-0025 |

Tabelle 19 Bestellinformationen der allel-spezifischen Mentype® **DigitalQuant** Assays - diese Assays werden für Sie auf Anforderung hergestellt (On-demand)

| Assay | 25 Reaktionen |
|-------------|---------------|
| DP67-D+SRY | 45-02311-0025 |
| DP70-D+SRY | 45-02321-0025 |
| DP70-I+SRY | 45-02331-0025 |
| DP88-D+SRY | 45-02341-0025 |
| DP88-I+SRY | 45-02351-0025 |
| DP97-I+SRY | 45-02361-0025 |
| DP101-D+SRY | 45-02371-0025 |
| DP101-I+SRY | 45-02381-0025 |
| DP104-D+SRY | 45-02391-0025 |
| DP104-I+SRY | 45-02401-0025 |
| DP105-D+SRY | 45-02411-0025 |
| DP105-I+SRY | 45-02421-0025 |
| DP106-I+SRY | 45-02431-0025 |
| DP114-D+SRY | 45-02441-0025 |
| DP114-I+SRY | 45-02451-0025 |
| DP128-D+SRY | 45-02461-0025 |
| DP131-I+SRY | 45-02471-0025 |
| DP133-I+SRY | 45-02481-0025 |
| DP134-I+SRY | 45-02491-0025 |
| DP140-I+SRY | 45-02501-0025 |
| DP152-D+SRY | 45-02511-0025 |
| DP163-D+SRY | 45-02521-0025 |
| DP163-I+SRY | 45-02531-0025 |
| DP301-D+SRY | 45-02541-0025 |
| DP301-I+SRY | 45-02551-0025 |
| DP304-D+SRY | 45-02561-0025 |
| DP304-I+SRY | 45-02571-0025 |
| DP307-I+SRY | 45-02581-0025 |
| DP310-I+SRY | 45-02591-0025 |

Biotype GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN / GERMANY
Tel. +49 351 8838 400
Fax +49 351 8838 403
support@biotype.de
www.biotype.de