

Mentype[®] DigitalScreen

Handbuch

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für medizinische Diagnostik

DGSHB01v1de
März 2022



45-64610-0004



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Made in Germany

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

Unsere Mentype® Test Kits garantieren höchste Qualitätsstandards.

Für Informationen und Anregungen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.
Kontaktieren Sie uns oder besuchen Sie unsere Homepage www.biotype.de.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Produktbeschreibung | 4 |
| 1.1 Zusammenfassung und Erläuterung | 4 |
| 1.2 Plattform und Software | 5 |
| 2. Mitgelieferte Materialien | 6 |
| 2.1 Kit Inhalt | 6 |
| 2.2 Bestellinformationen | 6 |
| 2.3 Zusätzliche benötigte Reagenzien und Materialien | 6 |
| 3. Warn- und Sicherheitshinweise | 8 |
| 3.1 Sicherheitshinweise | 8 |
| 3.2 Qualitätskontrolle | 8 |
| 3.3 Marken und Patente | 8 |
| 3.4 Lagerung | 8 |
| 4. Durchführung Mentype® DigitalScreen | 9 |
| 4.1 Probenentnahme und -Handhabung | 9 |
| 4.2 Ansetzen des PCR Master Mix | 10 |
| 4.2.1. Positiv-Kontrolle PTC (nicht im Kit enthalten) | 11 |
| 4.2.2. Negativ-Kontrolle NTC | 11 |
| 4.3 Restriktionsverdau | 11 |
| 4.4 Ansetzen der Droplet Digital PCR - Tröpfchenerzeugung | 11 |
| 4.5 Digital PCR Amplifikation | 13 |
| 4.6 Auslesen der Tröpfchen und Analysieren der Ergebnisse | 13 |
| 4.6.1. Erstellen des Platten-Layouts | 13 |
| 4.6.2. Datenanalyse | 14 |
| 4.6.3. Identifizierung der Informativen Loci | 16 |
| 5. Charakteristik und Verfügbarkeit der Mentype® DigitalQuant Assays | 17 |
| 6. Referenzen | 19 |
| 7. Bestellinformation Mentype® DigitalQuant | 20 |

Mentype[®] DigitalScreen

Nur für Forschungszwecke

1. Produktbeschreibung

Das Testkit Mentype[®] **DigitalScreen** ist zur qualitativen Bestimmung der Allelverteilung von Insertions-Deletions-Polymorphismen in ungemischten DNA-Proben bestimmt. Eine Quantifizierung unter Nutzung des Kits Mentype[®] **DigitalScreen** ist nicht möglich.

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

Das Testkit darf nur von professionellen Nutzern angewendet werden, die auf molekularbiologische Techniken im Allgemeinen und die Durchführung der digitalen PCR im Besonderen geschult sind.

1.1 Zusammenfassung und Erläuterung

Der Mentype[®] **Digital** Ansatz setzt die hochempfindliche digitale PCR-Technologie ein, die eine absolute Quantifizierung der DNA ermöglicht. Spezifisch für die digitale PCR (ddPCR) ist die Proben-Partitionierung in eine große Anzahl von Nano-Tröpfchen. Jedes Tröpfchen stellt ein separates Kompartiment dar, welches Nano-Liter der Probe enthält. Während des PCR fungiert jedes Tröpfchen als separate PCR-Reaktionskammer. Je nachdem, wie viele Exemplare der Ziel-DNA-Moleküle in die Tröpfchen aufgeteilt wurden (Null, eine oder mehrere Kopien), wird eine Vielzahl von Replikaten pro einzelnen PCR-Lauf erzeugt. Mit Hilfe der Poisson-Statistik kann die absolute Anzahl der Startkopien sehr genau bestimmt werden. Nach der PCR wird jedes Tröpfchen automatisch analysiert und für eine Ziel-DNA der positive oder negative Anteil bestimmt.

Mentype[®] **DigitalScreen** repräsentiert eine Screening-Platte zur qualitativen Detektion biallelischer Short Insertions-/Deletions-Polymorphismen (INDELs). Die hierdurch identifizierten Marker können für die anschließende DNA-Quantifizierung mit dem Kit Mentype[®] **DigitalQuant** genutzt werden.

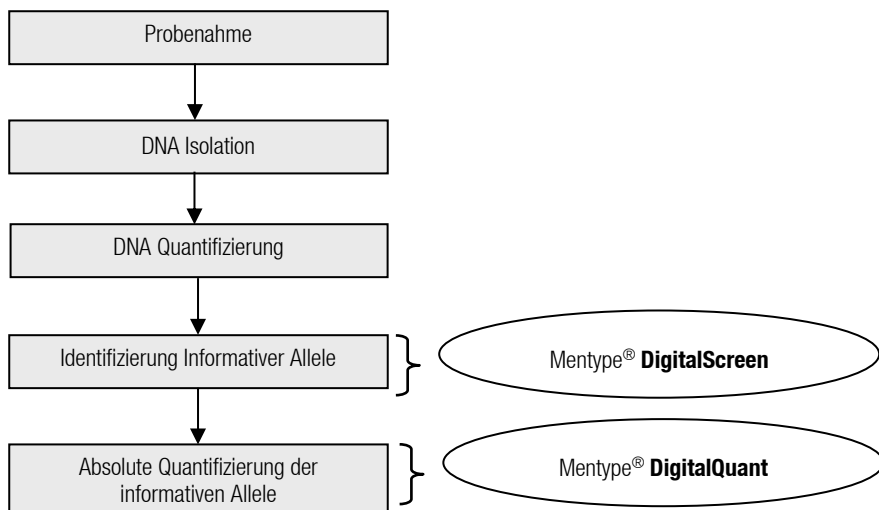


Abbildung 1 Von der Probe bis zur Analyse mit dem Mentype® **DigitalScreen** Assay

Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 8) sind mit FAM markiert, die aktive Referenz (REF) ist mit HEX markiert.

1.2 Plattform und Software

Das Testkits Mentype® **DigitalScreen** wurde mit dem Bio-Rad QX100™ und QX200™ Droplet Digital™ PCR System und dem folgenden Thermocycler 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 Anwendung und Durchführen des Mentype® **DigitalScreen** Assays auf Instrumenten, die nicht oben erwähnt sind, liegt in der Verantwortung des Anwenders und muss eigenverantwortlich validiert werden.

2. Mitgelieferte Materialien

2.1 Kit Inhalt

Die folgenden Reagenzien zur Durchführung des Kits Mentype® **DigitalScreen** sind im Lieferumfang enthalten:

Tabelle 1 Kitinhalt eines Mentype® **DigitalScreen** Kits

| Komponente | Reagenz | Anzahl | Vol./Tube [µL] | Deckel-farbe | Lagerung |
|---|---|--------|----------------|--------------|-------------------|
| Nuclease-Free Water | Nuklease-freies Wasser | 2 | 1.500 | Blau | -25 °C bis -15 °C |
| Mentype® DigitalScreen screening plate | Screeningplatte Mentype® DigitalScreen | 4 | - | - | 2 bis 8 °C |

2.2 Bestellinformationen

Bestellungen richten Sie bitte schriftlich an:

Email: sales@biotype.de

Fax: +49 (0)351 8838 403

Tabelle 2 Bestellinformation des Mentype® **DigitalScreen** Kits

| Produktname | Packungsgröße | Bestellnummer |
|-------------------------------|---------------|---------------|
| Mentype® DigitalScreen | 4 Platten | 45-64610-0004 |

2.3 Zusätzliche benötigte Reagenzien und Materialien

Folgende Reagenzien sind erforderlich, um den Mentype® **DigitalScreen** Assay auf der ddPCR Plattform QX100™/QX200™ auszuführen:

Tabelle 3 Zusätzliche benötigte Reagenzien für Mentype® **DigitalScreen**

| Reagenzien | Anbieter |
|--|------------------------------|
| 2x 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 | 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 |
| 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 |

3. Warn- und Sicherheitshinweise

3.1 Sicherheitshinweise

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

Das Mentype® **DigitalScreen** Kit muss bei einer Temperatur von 2 - 8 °C (Kühlschrank) vor Licht geschützt und trocken gelagert werden.

Das Haltbarkeitsdatum der Kits ist auf dem Außenetikett angegeben.

4. Durchführung Mentype® DigitalScreen

Die Analyse der DNA-Anteile beginnt mit dem Mentype® **DigitalScreen**, um die informativen Marker zu bestimmen, welche für die Quantifizierung mit dem Kit Mentype® **DigitalQuant** eingesetzt werden können.

Die Mentype® **DigitalScreen** Platte enthält dehydrierte DIP-Locus spezifische Primermischungen sowie die aktive Referenz (REF). Zwei DNA-Proben können gegen ein Set von 30 Assays in einem Durchlauf auf DNA-spezifische Unterscheidungsmerkmale analysiert werden. Das Platten-Layout ist unten dargestellt (Abbildung 2).

Achten Sie darauf, die Platte in der **richtigen Ausrichtung** zu benutzen (mit den Buchstaben auf der linken Seite).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|----|----|----|
| A | 67-D | 104-D | 131-I | 301-I | 67-D | 104-D | 131-I | 301-I | | | | |
| B | 70-D | 104-I | 133-I | 304-D | 70-D | 104-I | 133-I | 304-D | | | | |
| C | 70-I | 105-D | 134-I | 304-I | 70-I | 105-D | 134-I | 304-I | | | | |
| D | 88-D | 105-I | 140-I | 307-I | 88-D | 105-I | 140-I | 307-I | | | | |
| E | 88-I | 106-I | 152-D | 310-I | 88-I | 106-I | 152-D | 310-I | | | | |
| F | 97-I | 114-D | 163-D | SRY | 97-I | 114-D | 163-D | SRY | | | | |
| G | 101-D | 114-I | 163-I | PTC | 101-D | 114-I | 163-I | PTC | | | | |
| H | 101-I | 128-D | 301-D | NTC | 101-I | 128-D | 301-D | NTC | | | | |

DNA 1
DNA 2

Abbildung 2 Belegungslayout des Mentype® DigitalScreen Kits

4.1 Probenentnahme und -Handhabung

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

Zur DNA-Extraktion sollten kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von genomischer DNA genutzt 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 DNA kann durch Verdünnung mit 1x TE-Puffer auf die benötigte Konzentration eingestellt werden. DNA sollte bei $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ gelagert werden.

4.2 Ansetzen des PCR Master Mix

Tabelle 5 zeigt die erforderlichen Volumina und die Endkonzentration der Reagenzien zum Ansetzen einer Mentype® **DigitalScreen** Platte. Spalte 4 zeigt ein Beispiel für die Vorbereitung des PCR-Master-Mixes für eine Screening-Platte mit einem Probenvolumen von 5 µL.

Alle Komponenten sollten vor dem Vorbereiten des PCR-Master-Mixes gemischt (vortexen) und für ca. 10 s zentrifugiert werden. Um Pipettierfehler zu kompensieren, fügen Sie zu der benötigten Anzahl an Reaktionen ein oder zwei zusätzliche Reaktionen hinzu. Verteilen Sie den PCR-Master Mix gleichmäßig über die Wells. Das Volumen pro Well hängt vom eingesetzten DNA-Probenvolumen ab.

Tabelle 5 Reaktionsansatz zur Bearbeitung einer Platte Mentype® **DigitalScreen** unter Verwendung von 5 µL DNA je Well

| Komponente | Volumen pro Reaktion | Finale Konzentration | Mastermix für 66 Reaktionen (1 Platte) |
|---|----------------------|----------------------|--|
| 2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) | 10,0 µL | 1x | 660,0 µL |
| FastDigest <i>EcoRI</i> Enzym | 0,5 µL | | 33,0 µL |
| Nuclease-Free Water | 4,5 µL | | 297,0 µL |
| Volumen Mastermix je Well | 15,0 µL | | 15,0 µL |
| DNA 2-4 ng/µL | 5,0 µL | 10-20 ng/Well | 5,0 µL/Well |

Hinweis: Die DNA-Konzentration für jede Probe pro Well sollte **10-20 ng** in einem maximalen Volumen von 9,5 µL betragen. Für eine gegebene Probe sollten alle Wells die gleiche Menge an DNA enthalten.

Legen Sie in jedes Well 15 µL des Mastermixes vor, pipettieren Sie anschließend je Well 5 µL der entsprechenden DNA oder Kontrolle hinzu. Verschließen Sie die Platte mit einer

PCR Folie und mischen Sie die Platte gründlich (vortexen), so dass sich die getrocknet vorliegenden Primer vollständig lösen. Zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

4.2.1. Positiv-Kontrolle PTC (nicht im Kit enthalten)

Geben Sie anstelle von Proben-DNA 5 µL der DIP Positive Control DNA Mischung (DPC, Biotype GmbH) in das dafür vorgesehene Wells **G4** und **G8** (vgl. Abbildung 2) der Screening-Platte.

4.2.2. Negativ-Kontrolle NTC

Nuklease-freies Wasser dient als Negativ-Kontrolle (NTC). Anstelle des DNA-Templates pipettieren Sie 5 µL nuklease-freies Wasser im jeweiligen Volumen in die Wells **H4** und **H8** der Screening-Platte (vgl. Abbildung 2).

4.3 Restriktionsverdau

Die Biotype Mentype® **Digital**-Assays sind **spezifisch für den *EcoRI***-Restriktionsverdau.

Der Restriktionsverdau der zu analysierenden DNA vor der Tröpfchenerzeugung wird empfohlen. Der Verdau kann direkt im PCR-Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Verwenden Sie max. 1 µL FastDigest *EcoRI*-Enzym (siehe Tabelle 5), um bis zu 1 µg genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µL zu verdauen. Für die Verwendung von Non-FastDigest *EcoRI* Enzym werden 2 Einheiten pro 20 µL Reaktion empfohlen.

Nach der Vorbereitung der Screeningplatte mit PCR-Master-Mix, Proben-DNA und Kontrollen, verschließen Sie die Platte mit einer PCR-Folie (nicht mitgeliefert), mischen Sie gründlich (vortexen) und zentrifugieren Sie kurz. Anschließend inkubieren Sie die Screeningplatte im Thermocycler für **10 min bei 37 °C** für den Restriktionsverdau.

4.4 Ansetzen der Droplet Digital PCR - Tröpfchenerzeugung

Für optimale Ergebnisse mischen Sie die in der Mentype® **DigitalScreen** Platte vorgegebenen Proben vor der Tröpfchenerzeugung durch auf- und ab pipettieren. Achten Sie darauf, hierbei keine Bläschen in den Reaktionsansatz einzubringen.

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 von 1A nach 1H. Übertragen Sie die Proben in der DG8-Cartridge von links nach rechts. Alle 8 Wells/Reaktionsgefäße der DG8 Cartridge müssen entweder mit Probe oder mit 1x Biorad Buffer Control (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/Reaktionsgefäße der DG8 Cartridge verteilen werden, wenn alle 8 Wells/Reaktionsgefäße mit Probe befüllt wurden.

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

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

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

Pipettieren Sie die weiteren Proben in folgender Reihenfolge: von Reihe 2A–2H nach Reihe 8A–8H.

Hinweis: Handhaben Sie die Proben nach der Tröpfchenbildung vorsichtig (kein vortexen, kein zentrifugieren).

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.

4.5 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 Mentye® DigitalScreen*

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

4.6 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 Tröpfchenlesers.

Hinweis: Platte nicht vortexen und nicht zentrifugieren!

4.6.1. Erstellen des Platten-Layouts

Öffnen Sie die Software Quanta™Soft von Bio-Rad. Erstellen Sie das Platten-Layout für Ihr Experiment (vgl. Abbildung 2). 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. Anschließend vergeben Sie die Proben-Namen der Empfänger- und Spender-DNA

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

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

| Proben und Experiment Optionen | Einstellung |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Sample | |
| Name | vergeben Sie einen Probennamen |
| 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* |
| Type | z. B. Ch 2 Unknown |

*Bei Anwendung des Mentype® **DigitalScreen** ist der HEX-Kanal immer als Referenz (REF) definiert.

Hinweis: Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 9) sind mit FAM markiert. Die Referenz (REF) ist entsprechend mit HEX markiert.

Nach Erstellung des Platten-Layouts starten Sie durch klicken den **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 Daten von **mindestens 10.000** akzeptierten Tröpfchen verwendet.

4.6.2. Datenanalyse

Laden Sie die Platte in das Setup-Fenster der Quanta™Soft Software (Bio-Rad). Klicken Sie auf **analysieren**, um die Daten zu öffnen und zu analysieren. Überprüfen Sie die

Daten im 2D Amplitude-Kanal, um sicherzustellen, dass die automatisierte Cluster-Trennung korrekt ist (siehe Abbildung 3).

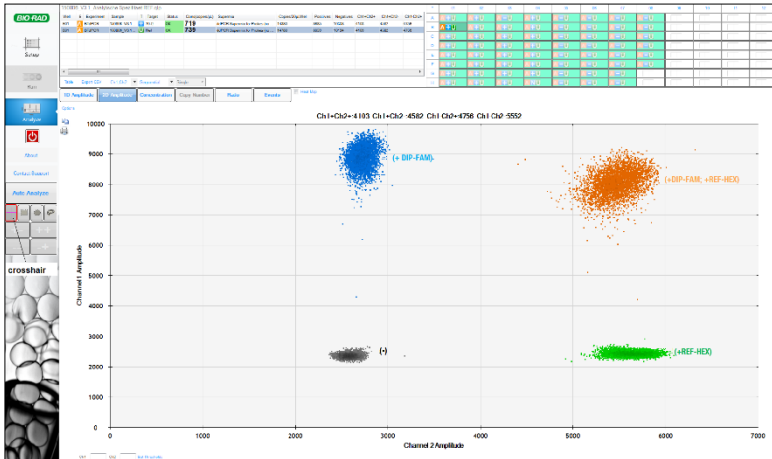


Abbildung 3 Ansicht 2D-Amplitude (Scatter Blot) der Tröpfchenfluoreszenz

Alle 4 Cluster (grau, grün, orange, blau) müssen vollständig getrennt sein (siehe Abbildung 3). 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 die Farbe des Clusters bzw. einzelner Tröpfchen sich umwandelt und das Fadenkreuz rosa angezeigt ist.

Wählen Sie anschließend die zu analysierenden Wells aus und klicken Sie auf **Table**.

Öffnen Sie anschließend die **Result Table** um die Ergebnisse einzusehen.

Das Detektionslimit für ein erfolgreich durchgeführtes Experiment liegt bei fünf FAM-positiven Tröpfchen. Ein Ergebnis mit weniger als fünf Tröpfchen wird als negativ definiert, der FAM-Cluster wurde nicht erkannt.

4.6.3. Identifizierung der Informativen Loci

Vergleichen Sie die FAM-Cluster der verschiedenen Ausgangs-DNA Proben. Loci, die in der Probe DNA 1 (vgl. Abbildung 2) positiv und in der Probe DNA 2 negativ sind, werden für die absolute Quantifizierung mit den Mentype® **DigitalQuant** Duplex Assays empfohlen. Loci, die für die Probe DNA 2 positiv und für die Probe DNA 1 negativ sind, können jedoch ebenfalls zur Quantifizierung genutzt werden.

Um zu bestimmen, ob das identifizierte DIP-Allel (Allel of Interest, AOI) homozygot oder heterozygot ist, verwenden Sie die folgende Formel:

Verhältnis in Prozent = $(100 \cdot \text{conc AOI}) / \text{conc REF}$

Wenn das prozentuale Verhältnis von Kopien/µl AOI zu den Kopien/µl Referenz (REF) **weniger als 65 %** beträgt, ist das AOI im Marker **heterozygot**. Ist das Verhältnis **größer als 65 %**, so ist der Marker **homozygot**. Diese Information ist für die Berechnung der Quantifizierung mit Mentype® **DigitalQuant** zu beachten (siehe Gebrauchsanweisung Mentype® **DigitalQuant**).

Für eine statistisch gesicherte und robuste DNA Analyse, muss die Analyse mit 3 informativen Loci erfolgen. Nach der Auswahl der spezifischen Loci, können Sie die korrespondierenden Mentype® **DigitalQuant** Assays (vgl. Tabelle 9) über folgende Kontaktdetails bestellen:

Email: sales@biotype.de

Fax: +49 (0)351 8838 403.

5. Charakteristik und Verfügbarkeit der Mentype® DigitalQuant Assays

Tabelle 8 Lokusspezifische Information und chromosomale Lokation

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

Tabelle 9 Verfügbare 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 | |

6. 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.

7. Bestellinformation Mentype® DigitalQuant

Tabelle 10 Bestellinformation der allel-spezifischen Mentype® DigitalQuant Assays – diese Assays stehen Ihnen jederzeit 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 11 Bestellinformation der allel-spezifischen Mentype® **DigitalQuant** Assays - diese Assays werden **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