

Mentype® DIPscreen

Kullanım Talimatları

Kantitatif bir kimerizm analizine giriş

İn-vitro tanısal kullanım için



DISIFU01v3tr
Nisan 2023



45-45410-0025
45-45410-0100



Parti Kodu



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Üretim yeri: Almanya

BIOTYPE GmbH, PCR tabanlı, hızlı Mentype® tespit kitlerini geliştirir, üretir ve piyasaya sunar. Ürünlerimiz profesyonel medikal tanılar için hızlı ve güvenilir test yöntemlerini müşterilerimize sunmaktadır.

Mentype® test kitlerimiz, klinik araştırma ve tanı için en yüksek kalite standartlarını garanti eder.

Mentype® **DIPscreen** ile ilgili daha fazla bilgi ve sorularınız için lütfen iletişim kurmaktan çekinmeyiniz ya da şu web sitesini ziyaret edebilirsiniz:

www.biotype.de

Ürün Tanımı

Mentype® **DIPscreen**, donör ya da alıcıda bireysel olarak meydana gelen ve bilgilendirici lokusları içeren DIP polimorfizmlerini belirlemek üzere geliştirilmiş, çok katmanlı bir PCR uygulamasıdır. Tekli bir çok katmanlı PCR'de 33 DIP-lokus eşzamanlı olarak cinsiyete özgü lokus amelogenin ile birlikte ekrana gelebilir.

Mentype® **DIPscreen** kök hücre transplantasyonu sonrasında kimerizm numunelerinin izlenmesine aracılık eden bir çok katmanlı PCR uygulamasıdır. Esnek tahlil formatı, bireysel tanılarının da istenen zamanda yapılabilmesini sağlar.

Allojenik kök hücre transplantasyonundan kaynaklanan moleküler kimerizm analizi, transplantasyon greftinin seyrini kontrol etmek ve tehdit edici nöks riskini değerlendirmek için iyi bilinen bir yöntem haline gelmiştir. Moleküler kimerizm analizi, bialelik kısa ekleme/silme polimorfizmlerinin (DIP'ler, INDEL'ler) önemli yararlar sağladığı çeşitli DNA dizisi motifleri üzerinde gerçekleştirilebilir. DIP markörlerinin polimeraz aracılı amplifikasyonu, net analizleri engelleyebilecek stutter piklerin oluşumuyla sonuçlanmaz. Ayrıca, bu polimorfizmler allele özgü kantitatif yaklaşımlar için en uygun olanlardır. Mentype® **DIPscreen**, DIP tabanlı bir kimerizm analizidir ve bu nedenle açık bir donör / alıcı farklılaşması ve oldukça net bir kimerizm takibi sağlar.

Mentype® **DIPscreen** ile belirlenen 33 DIP lokus, 18 kromozom üzerinde dağılır ve her biri en az 10 Mbp ile ayrılır (bkz. Tablo 1). Mentype® **DIPscreen** tespit limiti yaklaşık **200 pg genomik DNA'dır**. Standart şartlar altında optimum aralık 1.0-2.0 ng DNA'dır. Hızlı ve hassas parça uzunluğu analiz primerleri, **6-FAM, BTG**, ya da **BTY ile flüoresan etiketlidir**.

Test kiti 36 cm kılcal dizin ve POP4® polimeri ile çalıştırılan GeneAmp® 9700 Silver, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ProFlex PCR System ve ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör, Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer kullanılarak doğrulanmış ve değerlendirilmiştir.

İçindekiler

1.	Mentype® DIPscreen Nedir?.....	5
2.	PCR amplifikasyonu.....	9
2.1	Temel karışımın hazırlanması.....	9
2.2	PCR amplifikasyonu parametreleri.....	10
3.	Kılcak Jel Elektrofrezisi.....	11
3.1	PCR ürünlerinin hazırlanması.....	11
3.2	Parça Uzunluğu Analizi.....	11
4.	Analiz.....	13
4.1	BIOTYPE şablon dosyaları.....	14
4.2	Kontroller.....	15
4.3	Parça ve allel uzunlukları.....	16
5.	Sonuçların yorumlanması.....	20
6.	Referanslar.....	21
7.	Sembol Açıklamaları.....	22
A	Analitik Doğrulama.....	23
A a)	Standart Reaksiyon ve partiye özgü toleransın belirlenmesi.....	23
A a)	Genotipleme Doğruluğu.....	23
A b)	Analitik Özgünlük (Spesifisite).....	24
A c)	Analitik Hassasiyet (Sensitivite).....	24
A d)	Farklı PCR Isıl döngüleyicilerin tahlil performansları.....	24
A e)	Karma DNA numuneleri.....	25
A f)	PCR Tavlama Sıcaklıkları.....	25
A g)	PCR tampon partilerdeki dalgalanmalar.....	25
A h)	Kullanım sırasında stabilite.....	26
B	Klinik performans verileri.....	26
B a)	Çalışma tasarımı, etik ve düzenleyici yönler.....	26
B b)	Referans Yöntemler.....	26
B c)	DNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırılması.....	26
B d)	Sonuçlar.....	27
B e)	Referanslar.....	29

1. Mentype® DIPscreen Nedir?

Tablo 1. Mentype® DIPscreen lokusa özgü bilgiler

DIP lokus	Kromozomal pozisyonu	Motif (-DIP / +DIP)
FAM Panel		
AM X	Xp22.1-22.3	
AM Y	Yp11.2	
HLD106	16q13	-AATGCGT
HLD70	6q16.1	-AGCA
HLD84	8q24.12	-CTTTC
HLD103	12q23.1	-GCTTATAA
HLD104	13q32.1	-ACTC
HLD116	18p11.22	-AGGTGTCGAACAACATGATAC
HLD112	17p12	-TTGTA
HLD307	Xp11.23	-TCAACCAA
HLD310	2p22.3	-GTCTGGTT
HLD110	16q22.1	-TCCCTG
HLD133	3p22.1	-CAACCTGGATT
HLD79	7q31.2	-AATCT
HLD105	14q24.3	-ATAGACAA
HLD140	3q23	-GGTAGTATGGCCT
HLD163	12q24.31	-AACTACGGCACGCC
BTG Panel		
HLD91	11q14.1	-GATA
HLD23	18p11.32	-CTTTAA
HLD88	9q22.33	-CCACAAAGA
HLD101	15q26.1	-GTAG
HLD67	5q33.3	-CTACTGAC
HLD301	17q21.32	-CAGGGGCTC
HLD53	3q22.1	-ATGT
HLD97	13q13.1	-AGAGAAAGCTGAAG
HLD152	16p13.2	-TGGTCAAAGGCA
HLD128	1q31.3	-ATTAATA
HLD134	5q11.2	-ATGATGGTCTTCAGA
HLD305	20q11.22	-CAAGGTCCCACCACACTCGCGTGGGA
BTY Panel		
HLD48	2q11.2	-GACTT
HLD114	17p13.2	-TCCTATTCTACTCTGAAT
HLD304	9q34.3	-GAGCTGCTCAAGAGAGAGG
HLD131	7q36.2	-TTGGGCTTATT
HLD38	1q32.2	-TAGTT
HLD82	7q21.3	-ACCTCTACTCCTTGGTCTATTCTGGTACATGTACT

Kısaltmalar: HLD = İnsan Lokus DIP, -DIP = Silme, +DIP = Ekleme

Tablo 1, Mentype® DIPscreen ile belirlenen DIP-lokusların kromozomal pozisyonlarını, motiflerini ve görel referans allellerini göstermektedir.

Kit içeriği

Mentype® **DIPscreen** (100 reaksiyon)

		25 reaksiyon	100 reaksiyon
Nuclease-Free Water	Nükleaz içermeyen su	1,5 mL	2 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reaksiyon karışımı A	125 µL	500 µL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	Primer karışım	125 µL	500 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase	Multi Taq 2 DNA polimerazı	15 µL	60 µL
ya da Polymerase N*	ya da polimerazı N*		
Mentype® DIPscreen Control DNA XY82 (2 ng/µL)	Kontrol DNA XY82 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Size Standard DNA 550 (BTO)	13 µL	50 µL
Mentype® DIPscreen Allelic Ladder	Allel merdiveni	25 µL	25 µL

* LEUK01107 parti numarası itibarıyla kit yeni bir Polymerase N*'sına sahip olacaktır.

Sipariş bilgileri

Tablo 2. Mentype® **DIPscreen** kitleleri için Sipariş Bilgileri

Ürün	Reaksiyon	Sipariş numarası
Mentype® DIPscreen	25 reaksiyon	45-45410-0025
Mentype® DIPscreen	100 reaksiyon	45-45410-0100

Depolama

Bütün bileşenleri -25 °C ila -15 °C'de muhafaza edin ve tekrarlayan eritme ve dondurma işleminden kaçının. Primer karışım ve allel merdiveni ışıktan uzak şekilde muhafaza edilmelidir. DNA numuneleri ve PCR sonrası reaktifler (Allel merdiveni ve Size Standard DNA), PCR reaktiflerinden ayrı bir şekilde saklanmalıdır. Son kullanma tarihleri, kit kapağı üzerinde belirtildiği gibidir.

Ek olarak istenen reaktifler

BIOTYPE PCR Amplifikasyon Kitini kullanmak için gereken diğer reaktifler şunlardır:

Tablo 3. Mentype® **DIPscreen** kitleler için gereken ek reaktifler

Reaktif	Tedarikçi	Sipariş numarası
Hi-Di™ Formamid, 25 mL	Applied Biosystems	4311320
Matrix Standards BT5	BIOTYPE GmbH	00-10421-0025
Çoklu kılcal araç (25 µL)		
Matrix Standards BT5	BIOTYPE GmbH	00-10421-0050
Çoklu kılcal araç (2 x 25 µL)		

Uyarılar ve güvenlik talimatları

Bütün BIOTYPE ürünleri için talep üzerine tarafınıza iletilen materyal güvenliği veri belgelerini (MSDS) inceleyin. Ek olarak gereken diğer reaktiflerin Materyal Güvenliği Veri Belgelerinin (MSDS) nüshaları için, lütfen ilgili üretici ile irtibata geçin.

Kalite güvence

Bütün kit bileşenleri, BIOTYPE GmbH'de yoğun bir kalite güvence sürecinden geçer. Test kitlerinin kalitesi sürekli takip edilerek, kısıtsız bir kullanımlarının olması sağlanır. Kalite güvence ile ilgili sorularınızın olması halinde lütfen bizimle irtibata geçin.

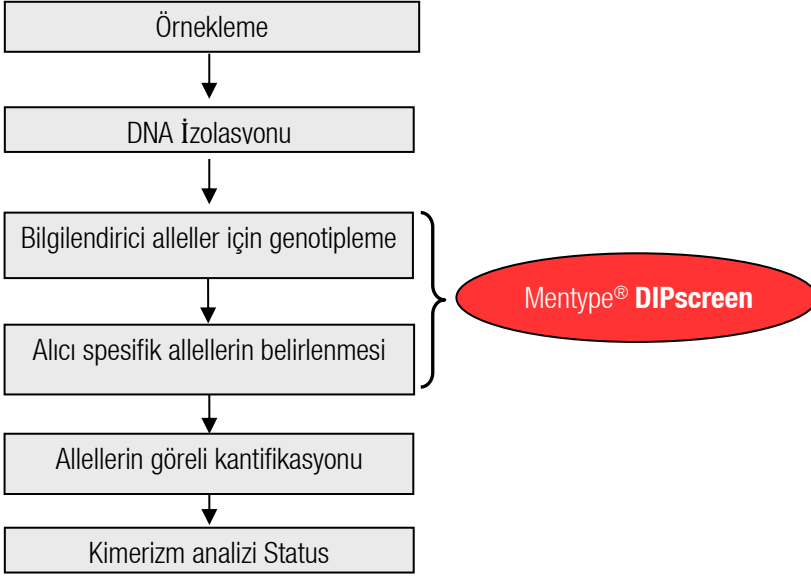
Ticari marka ve patentler

Mentype® ve Chimera®, BIOTYPE GmbH'nin tescilli ticari markalarıdır.

ABI PRISM®, GeneMapper®, GeneAmp® ve Applied Biosystems® Applied Biosystems LLC'nin tescilli ticari markalarıdır.

Avrupa kanunlarına göre POP-4®, Applied Biosystems LLC'nin tescilli ticari markasıdır. POP-4® Amerika'da ise Life Technologies Corporation şirketinin ticari markası olarak tescillenmiştir.

PCR, patentlidir. Patent sahipleri Hoffmann-La Roche Inc. ve F. Hoffmann-La Roche (Roche) şirketleridir.

Mentype® DIP- ürünleri ile gerçekleştirilen çalışma adımlarının taslağı

Örneklemeden analize - Mentype® **DIPscreen** ile kimerizm takibi

PCR amplifikasyonu, elektroforez ve analiz için protokoller

2. PCR amplifikasyonu

2.1 Temel karışımın hazırlanması

Aşağıdaki tabloda, her bir 25 µL reaksiyon hacmi için bütün PCR reaktiflerinin hacimleri, 1.0 µL (şablon DNA) numune hacim dahil üzere gösterilmektedir. Düzenlenecek olan reaksiyon sayısı, pozitif ve negatif kontrol reaksiyonları göz önüne alınarak belirlenmelidir. Pipetleme hatasını tazmin etmek üzere bu sayıya bir ya da iki reaksiyon ekleyin.

Tablo 4. Mentype® DIPscreen için Temel karışımın hazırlanması

Bileşen	Hacim
Nuclease-Free Water	13.4 µL
Reaction Mix A*	5.0 µL
Mentype® DIPscreen PrimerMix	5.0 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2,5 U/µL) veya Polymerase N	0.6 µL
Temel karışım hacmi	24.0 µL

* Mg²⁺, dNTPs, BSA içerir

Bütün bileşenler karıştırılmalı ve (vorteks) temel karışım hazırlanmadan önce yaklaşık 10 saniye santrifüjlenmelidir. Tahlilde kullanılacak DNA hacmi, konsantrasyonuna bağlıdır. Referans numuneler için en uygun hacim 1 µL'dir. Kritik hasta numuneleri için şablon miktarı uygun oranda artırılabilir. Nihai reaksiyon hacmini, nükleaz içermeyen su ile 25 µL'ye tamamlayın.

Genel olarak DNA şablonları nükleaz içermeyen suda ya da seyreltilmiş TE tamponda saklanabilir (10 mM Tris HCl, pH 8.0 ve 1 mM EDTA), örneğin 0.1 x TE tamponu.

Primer karışımlar, **28 PCR döngüsünde** ve 25 µL reaksiyon hacmindeki **1 ng Kontrol DNA XY82'**te dengeli bir pik yükseklik elde edecek şekilde hazırlanır. Daha fazla DNA şablonu uygulanırsa, küçük PCR parçaları için daha yüksek ve büyük parçalar için de görece daha düşük pikler beklenebilir. Bu dengesizliği düzeltmek için DNA şablonu miktarını azaltın.

Pozitif kontrol

Pozitif amplifikasyon kontrolü için, Kontrol DNA XY82'ü 1 ng/µL olarak şekilde seyreltin. Şablon DNA yerine, seyreltik Kontrol DNA'yı PCR temel karışımını içeren reaksiyon tüpüne damlatın.

Negatif kontrol

Negatif amplifikasyon kontrolü için, şablon DNA yerine PCR temel karışımını içeren reaksiyon tüpüne nükleaz içermeyen su damlatın.

Şablon DNA

Bazen ölçülen DNA konsantrasyonu, kullanılan kantifikasyon yöntemine göre değişir. Bundan dolayı, optimum sonuçlar elde etmek için DNA miktarını ayarlamak gerekebilir.

2.2 PCR amplifikasyonu parametreleri

DNA polimerazı aktive etmek ve spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşmasını önlemek için “otomatik başlatma” ile PCR gerçekleştirin.

PCR döngülerinin sayısı, uygulanan DNA miktarına bağlıdır. Bütün numuneler için 28 PCR döngüsü tavsiye edilir.

Standart yöntem

Bütün DNA numuneleri için tavsiye edilir.

Tablo 5. Mentye® **DIPscreen** için PCR amplifikasyon protokolü

Sıcaklık	Zaman	
94 °C	4 dakika (DNA polimerazı aktivasyonu için otomatik başlatma)	
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	28 döngü
72 °C	75 s	
68 °C	60 dakika	
10 °C	∞	tutma

Not: Optimum kit dengesini sağlamak için ısı döngüleyicilerde artış oranı 4-5 °C/s şeklinde ayarlanmalıdır.

Çok az miktarlardaki DNA, istatistiksel düşümlere ve pik noktalarda dengesizliğe neden olabilir. PCR döngüsü sayısının artması, minimal miktarlarda bulunan safsızlıkların neden olduğu çapraz -kontaminasyon riskini yükseltir. Ayrıca, spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri ortaya çıkabilir.

3. Kılcal Jel Elektrofrez

3.1 PCR ürünlerinin hazırlanması

PCR tamamlandıktan sonra numuneleri döngüleyiciden çıkartın ve kısaca santrifüjleyin. Hi-Di™ Formamid (kitte yer almaz) ve DNA Size Standard 550 (BTO) reaktiflerini çözündürün, karıştırın ve tüpleri kısa bir süre santrifüjleyin. Hi-Di™ Formamid ve DNA Size Standard 550 (BTO)'dan oluşan ve Tablo 6'da tanımlanan yaklaşımı hazırlayın, pipetleme değişkenliklerini tazmin etmek üzere, yaklaşıma bir ya da iki reaksiyon ekleyin.

Tablo 6. Hi-Di Formamid ve Size Standard 550 (BTO) içeren denatürasyon karışımı yaklaşımı

Bileşen	Reaksiyon başına hacim
Hi-Di™ Formamid	12.0 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	0.5 µL

Formamid ve DNA Size Standard 550 (BTO) denatürasyon karışımının 12 µL'sini bir PCR plakasının uygun sayıda yuvasına (Genetik Analizörde kullanım için uygun sayıda) pipetleyin. Daha sonra 1 µL PCR ürünü veya Mentype® **DIPscreen**'in 1 µL allel merdivenini yuvaya ekleyin. PCR plakasını uygun bir folyo ile kaplayın, vorteksleyin ve plakayı kısa bir süre santrifüje edin.

Not: Allel merdiveni, veri analizi sırasında analiz edilen parçaları doğru bir şekilde belirlemek için kullanılır. Başarılı veri analizini sağlamak için her bir parça uzunluğu analizi sırasında, allel merdiveni en az bir kez analiz edilmelidir.

Not: Jel elektrofrez cihazının kılcal kısımları asla kuru çalıştırılmamalıdır. Numuneler tüm kılcal pozisyonları kaplamıyor ise, plakanın diğer yuvalarını, kılcal sayısına göre 12 µL Hi-Di™ Formamid ile doldurun.

Hazırlanan PCR ürünlerini bir PCR döngüleyicide 95 °C'de 3 dakika denatüre edin ve ardından numuneleri, döngüleyicide 4 °C'de soğutun. Parça uzunluğu analizi öncesinde numuneleri kısa bir süre santrifüjleyin.

3.2 Parça Uzunluğu Analizi

Kılcal jel elektrofrez cihazının Matrix Standard BT5 multi (BIOTYPE GmbH) reaktifi ile spektral kalibrasyonu başarıyla yürütüldükten sonra, aşağıdaki parametrelerle spesifik bir çalıştırma modülü (ABI 3130) veya cihaz protokolü (ABI 3500) oluşturun:

Tablo 7. Çalıştırma modülü için spesifik parametreler, kılcal jel elektrofrez cihazının araç protokolü

	ABI 3130	ABI 3500
Enjeksiyon voltajı [kV]	3.0	3.0
Çalışma süresi	1500 s	1500 s
Enjeksiyon süresi [s]	10	10

Tablo 7'de verilen değerlerden farklı olarak alıştırma süresi, DNA Size Standard 550'nin bütün parçalarını (60-550 bp) analiz edecek şekilde ayarlanabilir.

Not: Spesifik alışma parametrelerini kurmak için kılcal jel elektroforez cihazının üreticisinin kullanım talimatlarını izleyin.

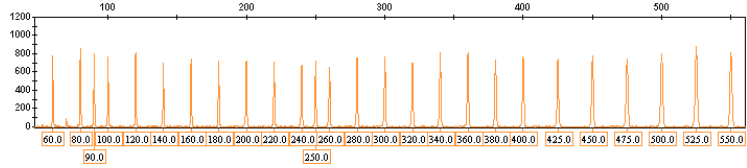
Not: Aynı zamanda, kılcal jel elektroforez cihazlarında bulunan Mentype® ürünlerinin kalibrasyonu ve uygulaması için ek bilgi broşürlerine bakın. Bunlar support@biotype.de üzerinden talep edildiğinde BIOTYPE GmbH tarafından temin edilir.

4. Analiz

Otomatik numune analizi konusundaki genel talimatlar için bkz. *GeneMapper® ID ya da GeneMapper® ID-X Software Kullanıcı Kılavuzu*.

Not: Mentype® **DIPscreen**'de, kırmızı panel soluk olmalıdır.

Yükseltilmiş ürünlerin asıl uzunluklarının bulunması, cihaz türüne, elektroforez şartlarına ve kullanılan Standart Boyutta DNA'ya bağlıdır. Bu nedenle aşağıdaki uzunlukta bulunan parçalar için Size Standard DNA 550 BTO kullanılmalıdır: **60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, ve 550** bp.



Şekil. 1 DNA Size Standard 550 (BTO) elektroferogramı, parça uzunlukları bp olarak verilmiştir.

Not: Size Standard DNA SST-BTO_60-450bp için sunulan şablon dosyaları, GeneMapper® ID ya da ID-X yazılımı kullanılarak Mentype® **DIPscreen** değerlendirme ve analizi için uygulanabilir.

4.1 BIOTYPE şablon dosyaları

Allel tahsisi, uygun bir analiz yazılımı ile gerçekleştirilmelidir, örneğin GeneMapper® ID/ID-X yazılımı, BIOTYPE GmbH'nin Mentype® **DIPscreen** şablon dosyaları ile birlikte kullanılabilir. BIOTYPE şablon dosyaları web sitemizden (www.biotype.de) yüklenebilir.

GeneMapper® ID/ID-X yazılımları için tavsiye edilen BIOTYPE şablonları şunlardır:

Paneller	DIPscreen_Panels_v1/v1X	Ya da daha ileri versiyonları
BinSets	DIPscreen_Bins_v1/v1X	Ya da daha ileri versiyonları
Size Standard	SST-BTO_60-450bp	
Analiz yöntemi	Analysis_DIPscreen_3130_200rfu Analysis_DIPscreen_3130_1000rfu	
Grafik ayarları	PlotsBT5_4dyes	
Tablo ayarları	2 allel için tablo	

Paneller ve BinSets her zaman kullanılmalıdır, diğer şablon dosyalar ise opsiyoneldir. GeneMapper® ID/ID-X yazılımı için hazırlanan BIOTYPE şablonları POP4® çalışmaları için üretilir. Diğer polimer türlerinin kullanılması halinde Panel ev Bin'lerde değişiklik gerekebilir ya da veri analizinden önce Analiz Yönteminin değiştirilmesi gerekebilir. Detaylı talimatlar için, GeneMapper® için BIOTYPE Şablon dosyaları talimatları sayfasını inceleyiniz, bu talimatları web sitemizden de indirebilirsiniz (www.biotype.de).

Önemli Not: Temin edilen şablon dosyalar ile içe aktarım ve allel alımı ancak GeneMapper® ID/ID-X yazılımı kullanıldığı zaman garanti edilir. GeneMapper® yazılımı uygulanırken bazı şablon dosyalarında içe aktarım problemleri yaşayabilirsiniz. Spesifik araç mekanizmanız üzerinde bir ya da daha fazla allel merdiveni çalıştırarak Panel ve Bin ayarlaması yapmanız gerekebilir. Destek için bizimle irtibata geçin (support@biotype.de).

Analiz için genel prosedür

1. Size Standard DNA kontrolü
2. Allel merdiveni kontrolü
3. Pozitif kontrolün kontrolü
4. Negatif kontrolün kontrolü
5. Numune verinin analizi ve yorumlanması

4.2 Kontroller

Test kitinin ve aynı zamanda standart hücre hatlarından elde edilen diğer ticari olarak bulunabilir DNA'ların bir parçası olan Kontrol DNA XY82, aşağıdaki allelleri temsil eder:

Tablo 8. Mentype® **DIPscreen** için Allel belirlemesi, -DIP = Silme, +DIP = Ekleme

Lokus	Kontrol-DNA XY82	Kontrol-DNA XY13	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
AM	XY	XY	XX	XX	XY	XY
HLD106	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+
HLD70	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-
HLD84	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-
HLD103	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+
HLD104	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-
HLD116	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-
HLD112	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+
HLD307	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
HLD310	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
HLD110	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
HLD133	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+
HLD79	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD105	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
HLD140	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+
HLD163	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+
HLD91	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
HLD23	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+
HLD88	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
HLD101	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
HLD67	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+
HLD301	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
HLD53	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-
HLD97	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+
HLD152	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD128	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
HLD134	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-
HLD305	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
HLD48	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+
HLD114	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+
HLD304	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-
HLD131	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+
HLD38	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+
HLD82	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+

Referans DNA K-562, ATCC'den elde edilebilir. DNA 9947A, 9948 ve 3657 Coriell Cell Repositories'den temin edilebilir.

4.3 Parça ve allel uzunlukları

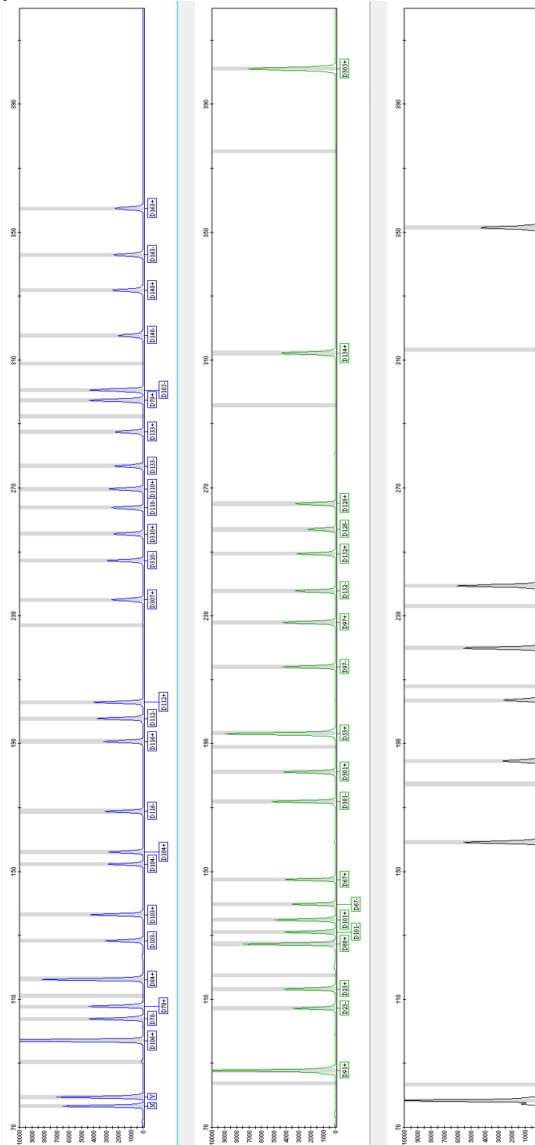
Tablo 9, DNA Size Standard 550 (BTO)'ya giden bireysel allellerin parça uzunluklarını gstermektedir. Bütün analizler, ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör üzerinde POP-4® polimer ile yapılmıştır. Farklı analiz araçları, DNA boyut standartları ya da polimerler, farklı parça uzunlukları verebilir. Buna ek olarak Allel merdiveni ile görsel olarak bir hizalama yapılması tavsiye edilir.

Ölçekleme

Yatay: 70-430 bp (bkz. Şekiller 2 ve 3)

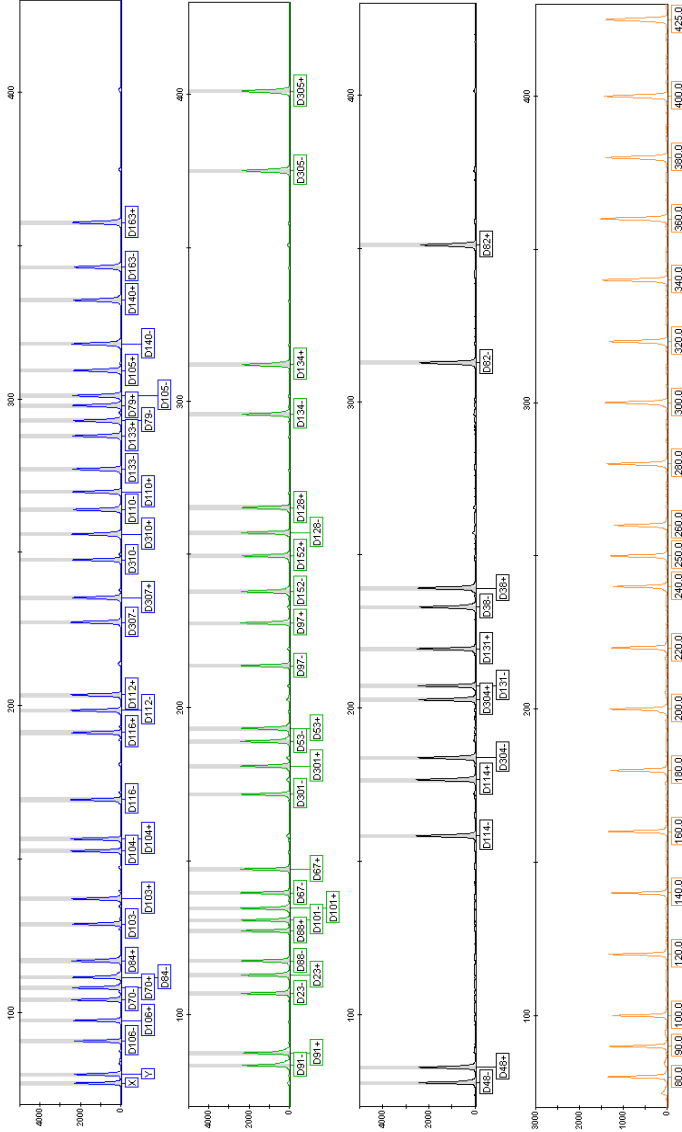
Dikey: sinyal yoğunluğuna bağlı olarak

Şekil 2



Şekil 2: 1 ng kontrol DNA XY82 kullanılan Mentype® DIPscreen elektrofegorami. Analiz, DNA Size Standard 550 (BTO) kullanılarak bir ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör üzerinde yapılmıştır. Allel tahsisi, GeneMapper® ID yazılımı ve Mentype® DIPscreen şablon dosyası kullanılarak yapılmıştır.

Şekil 3



Şekil 3. Mentype® **DIPscreen** allel merdiveni elektrofogramı. Analiz, DNA Size Standard 550 (BTO) kullanılarak bir ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör üzerinde yapılmıştır. Allel tahsisi, GeneMapper® ID yazılımı ve Mentype® **DIPscreen** şablon dosyası kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 9. POP-4® polimer kullanılarak ABI PRISM® 3130 Genetik Analizörde analiz edilen Mentype® **DIPscreen** Allel merdiveni parça uzunlukları (**FAM, BTG, BTY panel**)

Marker/FAM	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*	Marker/BTG	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
AM	77 (X)	80 (Y)	HLD91	84	88
HLD106	91	98	HLD23	107	113
HLD70	104	108	HLD88	118	128
HLD84	112	117	HLD101	131	135
HLD103	129	138	HLD67	140	148
HLD104	153	1157	HLD301	172	182
HLD116	170	192	HLD53	190	194
HLD112	199	204	HLD97	214	228
HLD307	228	236	HLD152	239	250
HLD310	248	257	HLD128	258	266
HLD110	264	270	HLD134	296	312
HLD133	278	288	HLD305	375	401
HLD79	294	299			
HLD105	302	310	Marker/BTY	-DIP [bp]*	+DIP [bp]*
HLD140	318	333	HLD48	78	83
HLD163	344	358	HLD114	159	177
			HLD304	184	203
			HLD131	208	220
			HLD38	234	240
			HLD82	314	352

* tamsayıya yuvarlanmıştır.

5. Sonuçların yorumlanması

Yukarıda bahsedildiği gibi, PCR sonrası analiz ve uygun analiz yazılımıyla otomatik allel tahsisi, allellerin kesin ve güvenilir bir şekilde ayırt edilmesini sağlar.

Pull-up peaks

Pull-up pikleri, doğrusal tespit aralığının (> 3 000 RFU) dışında pik yüksekliklerinin oluşması ya da yanlış bir matris uygulanması durumunda ortaya çıkabilir. Tipik olarak daha düşük sinyal yoğunluğu ile diğer renk kanallarındaki spesifik piklerde görünürler. Pull-up piklerini önlemek için pik yükseklikleri 3 000 RFY'yu aşmamalıdır.

Şablondan bağımsız olarak nükleotid eklenmesi

Terminal transferaz aktivitesi nedeniyle, Multi Taq 2 DNA polimerazı, yükseltilmiş DNA parçalarının 3'- ucuna, bir adenosin radikalini ekleme eğilimindedir. Neden olunan bu pik, beklenenden daha kısa bir bazdır (-1 bp pik). Tüm BIOTYPE primerleri, bu artefaktları en az indirecek şekilde tasarlanmıştır. Artefakt oluşumu, PCR protokolünün 68°C'de 60 dakika devam eden son uzatma aşaması ile daha da azaltılır. Artefakt pik yüksekliği, DNA miktarı ile ilişkilidir. Laboratuvarlar, piklerin analiz edilmesi için kendi limitlerini tanımlamalıdır.

Artefaktlar

Oda sıcaklığı, çoklu kılcal araçlar üzerinde PCR ürünlerinin performansını etkileyebilir ve omuz pikler ya da bölünmüş pikler meydana gelebilir. Ayrıca bazı durumlardan, otomatik tahsis de etkilenebilir. Bu etkiler ortaya çıkarsa, numunenin daha yüksek bir oda sıcaklığında tekrar enjekte edilmesini ve her bir çalıştırma başına birden fazla allel merdiveni numunesi kullanılmasını tavsiye ederiz.

Polimerlerin etkisi

Mentype® **DIPscreen**, POP-4® polimeri analizleri için doğrulanmış ve onaylanmıştır. Diğer polimerlerin kullanılması (örneğin, POP-7™ veya POP-6™), spesifik PCR ürünlerinin çalışma davranışını etkileyebilir. Ayrıca, serbest floresan boyaların farklı davranışları nedeniyle arka plan gürültüsü artabilir.

6. Referanslar

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.

Chen DP, Tseng CP, Wang WT, Wang MC, Tsai SH, Sun CF (2011) Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin Chim. Acta* 412, 625-630.

Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S (2005) Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant.* 35, 283-290.

Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, Ryder LP, Svejgaard A, Alizadeh M, Vindelov LL (2005) Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11, 558-566.

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

Qin XY, Li GX, Qin YZ, Wang Y, Wang FR, Liu DH, Xu LP, Chen H, Han W, Wang JZ, Zhang XH, Li JL, Li LD, Liu KY, Huang XJ (2011) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J (Engl.)* 124, 2301-2308.

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

Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M (2002) Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. *Biol Chem* 383, 1423-1433.

7. Sembol Açıklamaları



Üretici



Parti kodu



<N> test için yeterli sayıda reaktif içerir



Kullanım talimatlarını (el kitabını) inceleyiniz



İle birlikte kullanın



Sıcaklık sınırlılıkları



Katalog numarası



İn-Vitro-Tanı



Işıktan koruyun



Kuru muhafaza edin

Mentype® DIPscreen PCR-Amplifikasyon Kiti Teknik Özellikleri

A Analitik Doğrulama

A a) Standart Reaksiyon ve partiye özgü toleransın belirlenmesi

B **Amaç:** Çok katmanlı PCR'nin sinyal yükseklikleri dengesi ve taban çizgisinin, mutlak sinyal yükseklikleri (RFU) açısından standart reaksiyonda ce partiye özgü toleranslar varlığında belirlenmesi.

Metodoloji: Test kiti, sağlıklı bir donöre ait Kontrol DNA XY13 içerir, bu DNA 17 DIP sistemi ve amelogenin (AM) içinde heterozigodur. Standart reaksiyon, 1 ng'lik nominal konsantrasyonda Kontrol DNA'sı ile dörtlü belirlenmelerde gerçekleştirilmiştir (28 PCR söngüsü). DNA'sız dört boş değer (şablon kontrolü olmayan, NTC) ek olarak uygulanmıştır.

Sonuçlar: PCR primerlerinin partiye özgü karışımları için aşağıdaki özellikler belirlenmiştir: ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör kullanılarak 1 000-5 000 RFU sinyal yükseklikleri. Heterozigot sistemlerin sinyal yüksekliklerindeki dalgalanmalar, rehber değer in en fazla % 50'sine kadar olabilir. Ölçekleme aralığında, spesifik olmayan sinyaller 200 RFU, boş değerler için belirlenmemiştir.

A a) Genotipleme Doğruluğu

Amaç: Allel tahsisinin doğruluğu standart koşullar altında istatistiksel olarak kanıtlanmalıdır. Test, Allel merdiveni kullanılarak otomatik alel çağrısının doğruluğunu inceler. Ayrıca GeneMapper ID yazılımı kullanarak diğer yöntemler aracılığıyla (diğer PCR kiti, doğrudan sekanslama ve benzeri) test DNA'larının ön tiplemesine kıyasla allel tahsisinin uygunluğunu kontrol eder. Sonuçlara dayanarak, kılcal jel elektroforezi (bin ve paneller) yoluyla genotipleme için teste özgü cihaz ayarları ve DNA dizicisinin analiz şablonları için stutter piklerin oranı tanımlanmıştır.

Yöntem: Tekli belirlenmelerde, farklı kaynaklardan alınan (tam kan, yanak smear) 100 adet ön tiplemeli insan DNA'sı test edilmiştir. Buna ek olarak boş bir test de (DNA olmayan) yapılmıştır. Kabul kriterleri, ≥ 200 RFU pik yüksekliğe sahip tam profiller olarak tanımlanmıştır (manuel değerlendirme). [3; 4].

Sonuçlar: Teste özgü cihaz ayarlarının belirlenmesinden sonra, tüm HLD sistemleri ve amelogenin markörü için, tüm DNA numunelerine doğru genotip atanmıştır.

A b) Analitik Özgünlük (Spesifisite)

Amaç: Çalışmanın amacı, seçilen insan dışı DNA numuneleri ile çapraz reaktivite sonucu ortaya çıkabilecek yanlış pozitif sonuçları dışlamaktır. Ancak klinik uygulamada, insan dışı DNA'lar steril örnekleme nedeniyle büyük ölçüde hariç tutulabilir.

Yöntem: *Bos Taurus* (sığıır), *Sus scrofa domestica* (domuz), *Canis lupus familiaris* (köpek), *Felis catus* (kedi) ve *Oryctolagus cuniculus* (evcil tavşan) kaynaklı 2.5 ng genomik DNA test edilmiştir. Bu hayvan DNA'ları, veterinerlik çalışmalarının artık materyali olarak temin edilen kan numunelerinden elde edilmiştir

Sonuçlar: Allel alanında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir (< 200 RFU).

A c) Analitik Hassasiyet (Sensitivite)

Amaç: Analitik tespit sınırının belirlenmesi (sensitivite).

Yöntem: 1 ng ila 65 pg referans DNA içeren bir seyreltik serisi, dörtlü gruplar halinde test edilmiştir. Kabul kriteri olarak ≥ 100 RFU olan komple DNA profilleri tanımlanmıştır.

Sonuçlar: 200 pg genomik DNA tespit limiti belirlenmiştir.

A d) Farklı PCR Isıl döngüleyicilerin tahlil performansları

Amaç: Farklı üreticilere ait PCR ısıl döngüleyicilerin teknik özellikleri de farklı olmaktadır. Özellikle farklı ısıtma ve soğutma oranları ile farklı sıcaklık kontrol teknikleri gözlemlenebilmektedir (histeretik yöntemlere karşı asıl değerlerin ayar noktası ile simetrik olarak düzenlenmesi).

Yöntem: Aynı temel karışım ve 2 boş numune (DNA olmayan) ile dörtlü gruplar halinde şu ısıl döngüleyiciler kullanılarak, 1 ng nominal konsantrasyondaki Kontrol DNA ile standart reaksiyonun test edilmesi. Ayrıca DNA olmayan iki boş numune incelenmiştir.

GeneAmp 9700 with Silverblock (Applied Biosystems®, Life Technology GmbH, Darmstadt), GeneAmp 9700 with Alu block (Life Technology GmbH, Darmstadt) and Eppendorf Mastercycler ep-S (Eppendorf AG, Hamburg)

Sonuçlar: **Allel bölgesinde** Spesifik bir yan ürün ≥ 200 RFU tespit edilmemiştir. Standart reaksiyona kıyasla ortalama pik yüksekliğinden sapma, ≥ 2 °C/saniye tanımlı artışta % 20'dir.

A e) Karma DNA numuneleri

Amaç: Allojenik kan kök hücre transplantasyonu sonrası kimerizm analizinin amacı, donör ve alıcı DNA fraksiyonlarının tespiti ve göreceli kantifikasyonudur. Minimal kalıntı hastalığı saptamak için, mümkün olan en küçük miktardaki donör veya alıcı DNA, karışık bir numunede tespit edilmelidir. Bu nedenle farklı genotiplere sahip iki tanımlı DNA'nın farklı karışımları Analitik Doğrulama ile üretilmiştir.

Yöntem: % 0, % 1, % 5, % 10, % 30, % 50 ve % 70 şeklinde eksik DNA kullanılarak iki bağımsız DNA'nın 10 bağımsız karışımı hazırlanmıştır. Karışımlarsa iki DNA arasına, ortalama 13 DIP-lokus (12.8 ± 2.22) ve bilgilendirici alleller değerlendirme amacıyla ilave edilmiştir. Her durumda DNA karışımlarından 2 ng standart reaksiyonda test edilmiştir. En az 50 RFU olan sinyal yükseklikleri değerlendirilmiştir.

Sonuçlar: Eksik DNA için % 1 tespit limitine ulaşılabilmiştir. Bu da kimerizm analizlerinde kullanıldığı zaman, konvansiyonel, adli STR kitleri ile elde edilen % 1-5 değere karşılık gelmektedir [8-11].

A f) PCR Tavlama Sıcaklıkları

Amaç: PCR'nin sağlamlığını belirlemek amacıyla, çok katmanlı PCR'de primer bağlama aşaması (tavlama) için sıcaklık dalgalanmaları simüle edilir. Bu sıcaklık adımı, PCR'nin hassasiyeti ve özgünlüğü için kritiktir.

Yöntem: Kite özgü tavlama sıcaklığı olan 60 °C, standart reaksiyon ortamında Kontrol DNA ve 500 ng nominal konsantrasyon ile ± 1 °C ve ± 2 °C değiştirilmiştir. Aynı temel karışım ile üçlü tespit yapılmıştır.

Sonuçlar: ± 1 °C için spesifik olmayan bir yan ürün ≥ 200 RFU tespit edilmemiştir. ± 1 °C'de ortalama pik yükseklikler standart reaksiyondan en fazla ± 30 sapmıştır. + 2 °C'de bazı sistemlerde (HLD 84, 103, 116, 112, 133, 105, 40, 67, 48) performans düşüklüğü görülmüştür. Bir sistemde, bu sıcaklıkta komple profil kaybı (HLD 91) meydana gelmiştir.

A g) PCR tampon partilerdeki dalgalanmalar

Amaç: Çok katmanlı PCR'lerde, hassasiyet, özgünlük ve sinyal dengesi açısından PCR tamponu reaksiyon karışımı A'nın içeriklerinin konsantrasyon oranları (dNTP'ler, iyon konsantrasyonları, özellikle Mg^{2+}) kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, testin sağlamlığı, temin edilen PCR tamponundaki parti dalgalanmalarına karşı belirlenir.

Yöntem: Kontrol DNA ve 1 ng nominal konsantrasyon ile standart reaksiyondaki performansını görmek için 4 bağımsız reaksiyon karışımı A partisi test edilmiştir.

Sonuçlar: Spesifik olmayan bir yan ürün ≥ 200 RFU tespit edilmemiştir. Standart reaksiyona kıyasla, ortalama pik yükseklikler standart reaksiyondan en fazla % 20 sapmıştır.

A h) Kullanım sırasında stabilite

Amaç: PCR kitindeki reaktiflerin stabilitesi, tekrarlayan dondurma ve eritme işlemlerinden sonra test edilmiştir.

Yöntem: Kit reaktifleri, 20-katlı bir dondurma ve eritme döngüsüne tabi tutulmuştur. Dondurma işlemi, en az 1 saat boyunca -20 °C'de yapılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında eritilmiş ve reaktifler de kullanımdan önce çalkalama yoluyla homojenize edilmiştir. Bunun ardından 500 ng nominal konsantrasyonda Kontrol DNA ve DNA içermeyen ek boş değerler ile standart reaksiyon, üçlü belirlemeler halinde gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme, dondurma ve eritme döngüleri uygulanmadan önceki standart reaksiyon ile kıyaslanarak yapılmıştır.

Sonuçlar: Standart reaksiyona kıyasla ortalama pik yüksekliklerin sapsması en fazla % 20 'dir (özellikle sinyal kaybı). Boş değerler için ölçekleme aralığında ek pikler > 200 RFU bulunmuştur; ancak kitin allel aralığında pik meydana gelmemiştir(BTG panelindeki serbest flüoresan boyalar).

B Klinik performans verileri

B a) Çalışma tasarımı, etik ve düzenleyici yönler

German Medizinproduktegesetz'in §§ 20-24'üne göre bir klinik performans çalışması yapılmıştır. Protokol, German Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten, 7 maddesine uygun olarak ulusal yetkili kurum BfArM tarafından ve kurumun etik komitesi tarafından onaylanmıştır. Tüm katılımcıların yazılı rızası alınmıştır.

B b) Referans Yöntemler

Kitin performansı, Kısa Tandem Tekrarları (STR) temel alan CE-IVD Mentype® **Chimera** PCR-Amplifikasyon kiti (BIOTYPE GmbH, Dresden, DE) ile kıyaslanmıştır [12]. Bunun yanı sıra, yerinde hibridizasyon ile flüoresan kullanılarak (FISH) donör ve alıcı lökositlerin sitogenetik farklılaşması, kıyaslama için bir test olarak kullanılmıştır. Cinsiyet kromozomuna özgü CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Doğrudan Etiketli Floresan DNA Prob Kiti (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Almanya) üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. [11].

B c) DNA Ekstraksiyonu ve Safflaştırılması

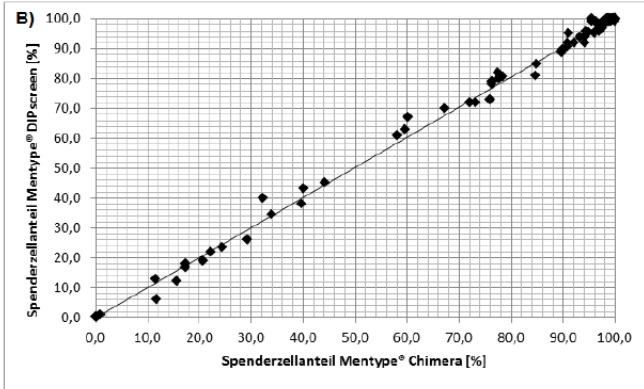
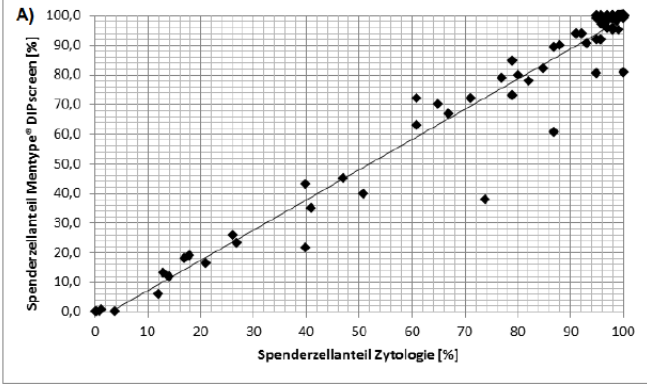
Heparinli tam kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu, QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) ile üretici talimatlarına uygun olarak yapılmıştır.

B d) Sonuçlar

Allojeneik kan kök hücresi ya da kemik iliği nakli sonrası farklı günlerde, toplam 98 veri seti yetişkin hastalardan toplanmıştır. Donör-alıcı çiftleri genetik cinsiyet açısından farklılık göstermektedir ve bu nedenle cinsiyet kromozomuna özgü FISH için uygun bulunmuştur. [10] Her bir PCR için en az 1.5 ng genomik DNA kullanılmıştır. İlk olarak, donör alıcı çiftlerin tüm bilgilendirici STR sistemleri belirlenmiş ve çok katmanlı PCR'nin bir parçası olan amelogenin markörünün genotiplenmesiyle cinsiyet doğrulanmıştır. PCR sonuçları için, bütün bilgilendirici STR- ya da DIP sinyal yüksekliklerinin ortalama değerleri kullanılmıştır (en az 2). Uyumluluk analizi sonuçları, Şekil 1'de özetlenmiştir.

Sitogenetik ile kıyaslandığında, Mentype® **DIPscreen** ile analiz edilen 11 numune, donör tarafından % 5'ten fazla bir sapma göstermiştir (mutlak) (bkz. Şekil 4A). Bu numunelerin 5'inde, hücre sayıları 200'ün önemli derecede altında olanlar sitogenetik olarak sayılmıştır. Ancak FISH kiti üreticilerinin tavsiyelerine göre en az 200 hücre sayılmalıdır. Uygulama önerilerine göre, daha yüksek mutlak hücre sayıları (500-1 000), daha iyi sitogenetik sonuçlar vermektedir [11, 13]. Sitogenetiğin aksine Mentype® **DIPscreen** ile STR tabanlı çok katmanlı PCR kiti Mentype® **Chimera**® arasındaki fark % 7.9'dur (bkz. Şekil 4B). 98 ölçüm verisi setinin sadece 3 tanesi % 5'in üzerinde bir sapma göstermiştir.

Şekil 4: Sitoloji (A) ve çok katmanlı PCR Mentype® Chimera® (B) ile kıyasla çok katmanlı PCR Mentype® DIPscreen uygunluk analizi



B e) Referanslar

- 1) **Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum BB, Wike C, Gilbert DA, Efcavitch JW.** High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res* 1998; 8: 69-80.
- 2) **Sgueglia JB, Geiger S, Davis J.** Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 1247-54.
- 3) **Gilder JR, Doom TE, Inman K, Krane DE.** Run-specific limits of detection and quantitation for STR-based DNA testing. *J Forensic Sci* 2007; 52: 97-101.
- 4) **Schneider PM, Fimmers R, Keil W, Molsberger G, Patzelt D, Pflug W, Rothämel T, Schmitter H, Schneider H, Brinkmann B.** The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int J Legal Med* 2009; 123: 1-5.
- 5) **Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Kapustin Y, Khovayko O, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Miller V, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusov RL, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (Database issue): D5-12.
- 6) **Haas-Rochholz H, Weiler G.** Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test. *Int J Legal Med* 1997; 110: 312-5.
- 7) **Peakall R and Smouse PE.** GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012; 28: 2537-2539.
- 8) **Thiede C, Lion T.** Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303-6.
- 9) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4: 177-87.
- 10) **Thiede C, Lion T.** Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. Appendix: Method in focus. *Leukemia* 2001; 15: 303-6.

- 11) **Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, Serrano D, Carrión R, Gómez-Pineda A, Díez-Martín JL.** A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90: 1373-9.
- 12) **Henke L, Muche M, Blaauw A, Van Eede PH, Martin W, Helmken C, Budowle B, Henke J.** Validation of a "new" short tandem repeat (STR) fluorescent multiplex system and report of population genetic data. *Clin Lab* 2007; 53:477-82.
- 13) **Mohr B, Koch R, Thiede C, Kroschinsky F, Ehninger G, Bornhäuser M.** CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 949-54.

BIOTYPE GmbH

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