

Mentype® Chimera®

Kullanım Talimatları

Kimerizm analizi için yeni standart

İn-vitro tanısal kullanım için:



CHNIFU01v4tr
Kasım 2022



45-13210-0025
45-13210-0100
45-13210-0400



Parti Kodu



Biotype GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Üretim yeri: Almanya

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

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

Mentype® **Chimera**® PCR amplifikasyon kiti ile ilgili daha fazla bilgi ve sorularınız için lütfen iletişim kurmaktan çekinmeyiniz ya da şu web sitesini ziyaret edebilirsiniz: www.biotype.de

Ürün Tanıtımı

Mentype® Chimera®, sırasıyla kan kök hücresi ve kemik iliği transplantasyonunun ardından kimerizm takibi gerçekleştirmek için özellikle geliştirilmiş, çok katmanlı bir PCR uygulamasıdır. Tahlil, 200'ün üzerinde HLA-eşleşmeli donör ve alıcı çift arasında kimerizm analizi yapılarak doğrulanmış ve uygunluğu karşılaştırmalı bir klinik değerlendirme çalışmasında onaylanmıştır. Analiz o tarihten beri rutin tanılarda başarı ile kullanılmaktadır.

Mentype® Chimera® tarafından belirlenen genetik markörler, 12 kromozom üzerinde dağıtılır ve çok yüksek bir heterozigotluk oranı ve dengeli bir allel dağılımı ile oldukça polimorfik olan kısa tandem tekrarlarını (SRT'ler) temsil ederler. Bunlar birlikte, donör-alıcı ayrımının yapılabilmesi için bilgilendirici lokusları belirleme şansını önemli ölçüde artırırken, kimerizm analizinin de güvenilir ve sağlam olmasını sağlar.

Bir PCR reaksiyonu eşzamanlı olarak **D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D21S2055, SE33 (ACTBP2)** otozomal lokusları ve cinsiyete özgü lokus Amelogenin'in eşzamanlı amplifikasyonunu sağlar. Her bir lokus için bir primerin **6-FAM, BTG** ya da **BTY** ile flüoresan etiketlenmesi sağlanır.

Mentype® Chimera® PCR amplifikasyon kitinin tespit limiti **200 pg genomik DNA'dır**. Standart şartlar altında optimal aralık **0.2-1.0 ng DNA'dır**.

Test kiti, POP-4® polimerin uygulanması ile GeneAmp® PCR Sistem 9700 Alüminyum, Eppendorf Mastercycler ep-S, Biometra T1, ProFlex PCR System, ABI PRISM® 310 Genetik Analizör ve ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör kullanılarak doğrulanmıştır ve Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer.

İçindekiler Tablosu

1. Mentype® Chimera® Nedir?	5
2. PCR amplifikasyonu	8
2.1 Temel karışımın hazırlanması	8
2.2 PCR amplifikasyon parametresi	9
3. Kılcal jel elektroforezi	10
3.1 PCR ürünlerinin hazırlanması	10
3.2 Parça uzunluğu analizi	10
4. Analiz	12
4.1 Biotype şablon dosyaları	12
4.2 Kontroller	13
4.3 Parça ve allel uzunlukları	14
5. Sonuçların yorumlanması	20
6. Nüfusların genetik verileri	21
7. Referanslar	24
8. Sembol Açıklamaları	25
A Analitik doğrulama	26
A a) Standart reaksiyon ve partiye özgü toleransın belirlenmesi	26
A b) Genotipleme doğruluğu	26
A c) Analitik özgünlük (spesifisite)	26
A d) Analitik hassasiyet (sensitivite)	27
A e) Farklı PCR ısı döngüleyiciler ile tahlil performansı	27
A f) Karma DNA numuneleri	27
A g) PCR tavlama sıcaklıkları	28
A h) PCR tampon partilerdeki dalgalanma	28
A i) PCR inhibitörleri	29
A j) Kullanım sırasında stabilite	29
B Klinik performans verileri	30
B a) Çalışma tasarımı, etik ve düzenleyici yönler	30
B b) Referans yöntemler	30
B c) DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması	30
B d) Sonuçlar	30
B e) Referanslar	31

1. Mentype® Chimera® Nedir?

Tablo 1. Mentype® Chimera® tarafından sunulan lokusa özgü bilgiler

Lokus	GenBank Erişimi	Referans allel tekrarlama motifi	Referans allel	Allel aralığı
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			
D2S1360	G08130	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [TATC] ₅	23	19-32
D3S1744	G08246	[TCTA] ₂ TA[TCTA] ₁₂ TCA [TCTA] ₂	16	13-22
D4S2366	G08339	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	12	9-15
D5S2500	G08468	[ATAG] ₁₂	12	9-18
D6S474	G08540	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	17	11-20
D7S1517	G18365	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂ CAAA [GAAA] ₂	17	14-31
D8S1132	G08685	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉ TCTGTCTA	20	12.1-27
D10S2325	G08790	[TCTTA] ₁₂	12	6-23
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	19.3	13-28
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S2055	G27274	[CTAT] ₂ CTAA [CTAT] ₉ CTA [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₃ TAT [CTAT] ₄ CAT[CTAT] ₂	24	16.1-39
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	3-50

Tablo 1, STR lokuslarını, Uluslararası Adli Genetik Topluluğu (ISFG; Bär *et al.*, 1997) mikro-uydu markörlerinin kullanımına ilişkin rehberler ile uyumlu ilgili tekrarlama motifleri ve allelleri ile birlikte sunmaktadır. STR lokusları ve D8S1132 ile D12S391 için isimlendirme Hering ve Müller'e göre (2001), D4S2366 ve D6S474 lokusları için Becker ve arkadaşlarına göre (2007), D10S2325 lokusu için Wiegand ve arkadaşlarına göre (1999) ve D7S1517 lokus için isimlendirme de Wiegand ve Klitschar'e göre (2002) yapılmıştır. Allel aralıkları mevcut literatürde yer alan ve Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsünün (NIST - 12/2008 itibarıyla) bütün bilinen allellerini içermektedir.

Tablo 2. Mentype® Chimera® kromozom haritalaması

Lokus	Kromozom haritalaması
Amelogenin X	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	Yp11.2
D2S1360	2p24-p22
D3S1744	3p24
D4S2366	4p16-15.2
D5S2500	5q11.2
D6S474	6q21-22
D7S1517	7q31.33
D8S1132	8q23.1
D10S2325	10p12
D12S391	12p13.2
D18S51	18q21.3
D21S2055	21q22
SE33	6q14.2

Kit içeriği

Mentype® Chimera® PCR Amplifikasyon Kiti

		25 reaksiyon	100 reaksiyon	400 reaksiyon
Nuclease-Free Water	Nükleaz içermeyen su	1,5 mL	2 x 1,5 mL	6 x 1,5 mL
Reaction Mix A	Reaksiyon karışımı A	125 µL	500 µL	2 x 1,0 mL
Mentype® Chimera® Primer Mix	Primer karışım	63 µL	250 µL	4 x 250 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase ya da Polymerase N*	Multi Taq 2 DNA polimerazı ya da polimerazı N*	10 µL	40 µL	160 µL
Mentype® Chimera® Control DNA XY1726	Kontrol DNA XY1726 (2 ng/µL)	10 µL	10 µL	10 µL
DNA Size Standard 550 (BTO)	Size Standard DNA 550 (BTO)	13 µL	50 µL	200 µL
Mentype® Chimera® Allelic Ladder	Allel merdiveni	25 µL	25 µL	4 x 25 µL

* **LEUK01093-LEUK01119** parti numarası itibarıyla kit bir Polymerase N'ına sahip olacaktır. **LEUK01124** parti numarası itibarıyla kit bir Multi Taq 2 DNA Polymerase'sına sahip olacaktır

Farklı kit partilerinden kit bileşenlerinin karıştırılmaması gerektiğini unutmayın. Parti numaralarının genel bir görüntüsü kutu kapağının içinde yer alan etiketten görülebilir. Kit bileşenlerinin başka reaksiyon kaplarına bölüntülenmesine izin verilmez.

Sipariş bilgileri

Mentype® Chimera®	25 reaksiyon	Kat. No.	45-13210-0025
Mentype® Chimera®	100 reaksiyon	Kat. No.	45-13210-0100
Mentype® Chimera®	400 reaksiyon	Kat. No.	45-13210-0400

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® Chimera® için gereken ek reaktifler

Reaktif	Tedarikçi	Sipariş numarası
Hi-Di™ Formamid, 25 mL	Life Technologies Corporation	4311320
Matrix Standard BT5 çoklu kılcal araçlar (25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0025
Matrix Standard BT5 çoklu kılcal araçlar (2 x 25 µL)	Biotype GmbH	00-10421-0050

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 kullanımının 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.

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® Chimera® için PCR temel karışım yaklaşımı

Bileşen	Hacim
Nuclease-Free Water	16.1 µL
Reaction Mix A	5.0 µL
Mentype® Chimera® Primer Mix	2.5 µL
Multi Taq 2 DNA Polymerase (hot start, 2.5 U/µL)	0.4 µL
ya da Polymerase N	
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 içermeye 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, **30 PCR döngüsünde** ve 25 µL reaksiyon hacmindeki **0.5 ng Kontrol DNA XY1726**'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 XY1726'ı 0.5 ng/µL olacak 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 amplifikasyon parametresi

Multi Taq 2 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 30 PCR döngüsü tavsiye edilir. Kritik numuneler (< 100 pg DNA) için PCR döngülerinin sayısı 32'ye çıkarılabilir.

Standart yöntem

Bütün DNA numuneleri için tavsiye edilir.

Tablo 5. Mentype® Chimera® için standart PCR amplifikasyon protokolü

Sıcaklık	Zaman	
94 °C	4 dakika	(Multi Taq 2 DNA polimerazı aktivasyonu için otomatik başlatma)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	30 döngü
72 °C	75 s	
68 °C	60 dakika	
10 °C	∞	tutma

Opsiyonel

Küçük miktarlardaki DNA için tavsiye edilir.

Tablo 6. Küçük miktarlardaki DNA için opsiyonel PCR amplifikasyon protokolü

Sıcaklık	Zaman	
94 °C	4 dakika	(Multi Taq 2 DNA polimerazı aktivasyonu için otomatik başlatma)
94 °C	30 s	
60 °C	120 s	32 döngü
72 °C	75 s	
68 °C	60 dakika	
10 °C	∞	tutma

Not: Hızlı ısıtma ve soğutma adımları olan ısı döngüleyiciler (> 2 °C/s) kullanılıyorsa, optimum kit dengesini sağlamak için artış oranı 2 °C/s şeklinde ayarlanmalıdır.

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

3. Kılcal jel elektroforezi

3.1 PCR ürünlerinin hazırlanması

PCR tamamlandıktan sonra numuneleri döngüleyiciden çıkartın ve kısaca santrifüjleyin. Hi-Di™ Formamid (kıtte yer almaz) ve DNA Size Standard 550 (BTO) reaktiflerini çözdürün, karıştırın ve tüpleri kısa bir süre santrifüjleyin. Hi-Di™ Formamid ve DNA Size Standard 550 (BTO)'dan oluşan ve Tablo 7'de tanımlanan yaklaşımı hazırlayın, pipetleme değışkenliklerini tazmin etmek üzere, yaklaşıma bir ya da iki reaksiyon ekleyin.

Tablo 7. Hi-Di Formamid ve DNA 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 BTO denatürasyon karışımının 12 µL'sini bir PCR plakasının uygun sayıda yuvasına (Genetik Analizde kullanım için uygun sayıda) pipetleyin. Daha sonra 1 µL PCR ürünü veya Mentye® Chimera®'nın 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 elektroforez 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 elektroforez cihazının Matrix Standard BT5 (Biotype GmbH) reaktifi ile spektral kalibrasyonu başarıyla yürütüldükten sonra, aşağıdaki parametrelerle spesifik bir çalıştırma modülü (ABI 3130) veya cihaz protokolü (ABI 3500) oluşturun:

Tablo 8. Çalıştırma modülü için spesifik parametreler, kılcal jel elektroforez cihazının araç protokolü

	ABI 3130	ABI 3500
Enjeksiyon voltajı [kV]	3.0	3.0
Çalışma süresi	1560 s	1560 s
Enjeksiyon süresi [s]	10	10

Tablo 8'de verilen değerlerden farklı olarak alıştırma süresi, 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.

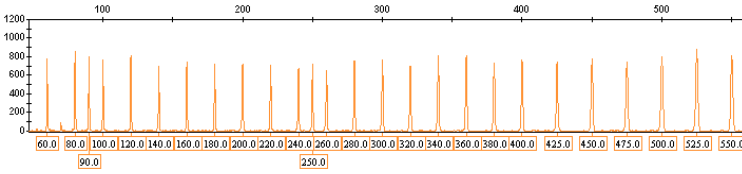
Not: Aynı zamanda, kılcal jel elektroforez cihazlarında bulunan Mentype® ürünlerinin kalibrasyonu ve uygulaması için ek bilgi broşürlerine bakın. Bunlar, support@biotype.de üzerinden talep edildiğinde Biotype GmbH tarafından temin edilir.

4. Analiz

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

Not: Mentype® **Chimera**®'da kırmızı panel soluk olmalıdır.

Yükseltilmiş ürünlerin asıl uzunluklarının bulunması, cihaz türüne, elektroforez şartlarına ve kullanılan Standart Boyutta DNA'ya bağlıdır. Bazı STR lokuslarının karmaşıklığından dolayı, boyutun belirlenmesi düzgün olarak dağıtılmış referanslara göre olmalıdır. 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 Size Standard DNA 550 (BTO) elektroferogramı, parça uzunlukları bp olarak verilmiştir.

Not: Size Standard DNA SST-BTO_60-500bp için sunulan şablon dosyaları, GeneMapper® ID ya da ID-X yazılımı kullanılarak Mentype® **Chimera**® 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® **Chimera**® şablon dosyaları ile birlikte kullanılabilir. Biotype şablon dosyaları web sitemizden (www.biotype.de) yüklenebilir ya da talep üzerine CD-ROM olarak temin edilebilir.

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

Paneller	Chimera_Panels_v2/v2X'	Ya da daha ileri versiyonları
BinSets	Chimera_Bins_v2/v2X'	Ya da daha ileri versiyonları
Size Standard	SST-BTO_60-500bp	
Analiz Yöntemi	Analysis_HID_3130 Analysis_HID_3130_50rfu	
Grafik ayarları	PlotsBT5_4dyes	
Tablo ayarları	2 Allel için tablo 10 Allel için tablo	

Paneller ve BinSets her zaman kullanılmalıdır, diğer şablon dosyalar ise opsiyoneldir.

GeneMapper® ID-X yazılımı için ek Biotype şablonları:

Stutter* Chimera_Stutter_v2X* Ya da daha ileri versiyonları

* Yukarıda belirtilen panelleri yüklerken, stutter ayarları kabul edilmeyecektir. Bu nedenle, stutter verilerinin ayrıca içe aktarılması gerekir.

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 XY1726, aşağıdaki allelleri temsil eder:

Tablo 9. Mentype® Chimera® allel dağılımı

Lokus	Kontrol DNA XY1726	Kontrol DNA XY5	ATCC K-562	CCR 9947A	CCR 9948	CCR 3657
Amelogenin	X/Y	X/Y	X/X	X/X	X/Y	X/Y
D2S1360	25/29	22/25	20/28	23/24	22/25	22/23
D3S1744	14/18	17/18	18/18	17/17	18/18	14/17
D4S2366	9/11	9/12	13/13	11/13	9/14	9/14
D5S2500	10/17	10/11	15/15	15/16	11/15	11/16
D6S474	14/15	15/16	14/17	13/17	16/16	15/16
D7S1517	19/25	22/27	21/24/25	19/25	20/22	24/25
D8S1132	18/22	18/20	20/24	19/21	20/24	17/18
D10S2325	9/11	13/14	7/13	9/10	8/14	9/14
D12S391	21/25	17/19	23/23	18/20	18/24	18/19
D18S51	12/13	13/15	15/16	15/19	15/18	12/20
D21S2055	19.1/21.1	25/27	28/35	19.1/26	19.1/26	19.1/25
SE33	26.2/28.2	15/21.2	26.2/28.2	19/29.2	23.2/26.2	22.2/27.2

Yukarıdaki tablo, ileri düzey bir doğrulama için, ATCC'den satın alınan referans DNA allelleri ve aynı zamanda Szibor vd. standardı (2003) olan ve Coriell Cell Repositories'den satın alınan üç referans DNA tahsisini göstermektedir.

4.3 Parça ve allel uzunlukları

Tablo 10 - 12, DNA Size Standard 550 (BTO)'ye giden bireysel allelerin parça uzunluklarını gstermektedir. Bütün analizler, ABI PRISM® 310/3130 Genetik Analizör üzerinde POP-4® polimer ile yapılmıştır. Farklı analiz araçları, Size Standard DNA ya da polimerler, farklı parça uzunlukları verebilir. Buna ek olarak Allel merdiveni ile görsel olarak bir hizalama yapılması tavsiye edilir.

Ölçekleme

Yatay: 70-480 bp

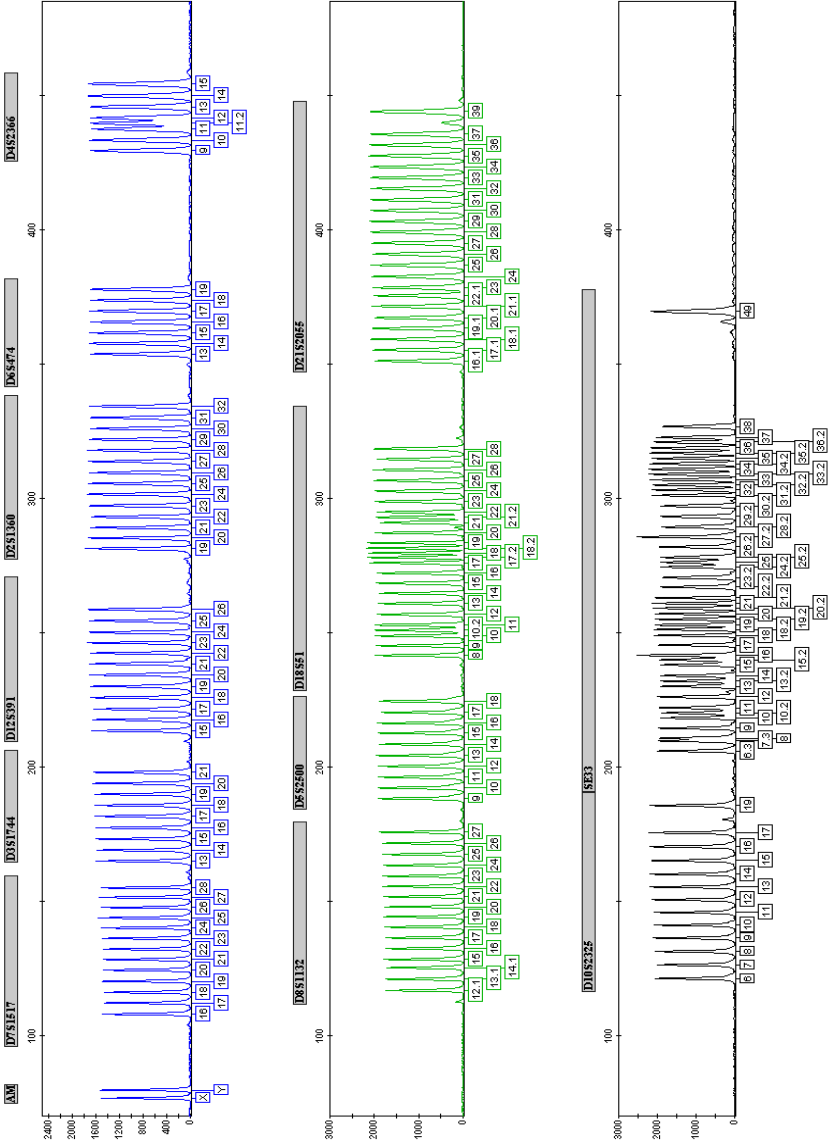
Dikey: Sinyal yoğunluğuna bağlı olarak

Şekil 2



Şekil 2 500 pg kontrol DNA XY1726 kullanılan Mentype® **Chimera**® elektrofogramı. Analiz, DNA Size Standard 550 (BTO) kullanılarak bir ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör üzerinde yapılmıştır. Allel tahsisi, GeneMapper® ID-X yazılımı ve Mentype® **Chimera**® şablon dosyası kullanılarak yapılmıştır.

Şekil 3



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

Tablo 10. POP-4® polimer kullanılarak ABI PRISM® 3130 Genetik Analizörde analiz edilen Mentype® Chimera® Allel merdiveni parça uzunlukları (mavi panel)

Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer alleller**	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer alleller**	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer alleller**
Amelogenin	6-FAM		D12S391	6-FAM		D6S474	6-FAM	
X	77		15	213		13	354	11, 12
Y	80		16	217	16.3	14	358	
			17	221	17.3	15	362	
D7S1517	6-FAM		18	226	18.3	16	366	
16	108	14, 15	19	230	19.1, 19.3	17	370	
17	112		20	234	20.3	18	374	
18	116		21	238		19	378	
19	120		22	242				
20	124		23	246		D4S2366	6-FAM	
21	128		24	250		9	429	9.2
22	132		25	254		10	433	10.2
23	136		26	258	27	11	437	
24	140					11.2	440	
25	144		D2S1360	6-FAM		12	441	
26	148		19	281		13	445	
27	152		20	285		14	449	
28	155	29	21	289		15	454	
			22	293				
D3S1744	6-FAM		23	297				
13	165		24	302				
14	169		25	306				
15	173		26	310				
16	177		27	314				
17	182		28	318				
18	186		29	322				
19	190		30	326				
20	194		31	330				
21	198	22	32	334				

Tablo 11. POP-4® polimer kullanılarak ABI PRISM® 3130 Genetik Analizörde analiz edilen Mentye® Chimera® Allel merdiveni parça uzunlukları (yeşil panel)

Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allelere **	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allelere **	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allelere **
D8S1132	BTG		D18S51	BTG		D21S2055	BTG	
12.1	117	12, 13	8	241	7	16.1	351	
13.1	121		9	245	9.2	17.1	355	
14.1	125	14.3	10	249		18.1	359	
15	128		10.2	251		19.1	363	
16	132		11	253	11.2	20.1	367	
17	136		12	257	12.2	21.1	371	
18	140		13	261	13.2	22.1	375	22
19	144		14	264	14.2	23	378	23.1
20	148		15	268		24	382	
21	151		16	272	16.2	25	386	
22	155		17	276		26	390	
23	159		17.2	278	17.3	27	395	
24	163		18	279		28	399	
25	167		18.2	281		29	403	
26	171		19	283	19.2	30	406	
27	175		20	287		31	411	
			21	291		32	415	
D5S2500	BTG		21.2	293		33	419	
9	188		22	295		34	423	
10	192		23	299	23.1	35	427	
11	196		24	302		36	431	
12	200		25	306		37	435	38
13	204		26	310		39	443	
14	208		27	314				
15	212		28	318	29			
16	216							
17	220							
18	224							

Tablo 12. POP-4® polimer kullanılarak ABI PRISM® 3130 Genetik Analizörde analiz edilen Mentype® Chimera® Allel merdiveni parça uzunlukları (sarı panel)

Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allel**	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allel**	Markör / allel	Boyut [bp]*	Diğer allel**
D10S2325	BTY		SE33	BTY		SE33	BTY	
6	121		6.3	205	4.2, 5.3	25.2	278	
7	126		7.3	209	7	26.2	282	26
8	131		8	210	8.2	27.2†	285	27
9	136		9	214	9.2	28.2	289	28, 28.3
10	141		10	218		29.2	293	29
11	145		10.2	220		30.2	297	30
12	150		11	222	11.2	31.2	301	31
13	155		12	226	12.2	32	303	
14	160		13	230		32.2	305	
15	165		13.2	232	13.3	33	307	
16	170		14	234	14.2, 14.3	33.2	309	
17	175	18	15	238		34	311	
19	185		15.2	240		34.2	313	
			16†	241	16.2, 16.3	35	315	
			17	245	17.2, 17.3	35.2	317	
			18	249		36	318	
			18.2	251	18.3	36.2	321	
			19	253		37	322	37.2
			19.2	255		38	326	39, 42
			20	257	20.1	49	369	50
			20.2	259				
			21	261				
			21.2	263	22			
			22.2	267				
			23.2	270	23			
			24.2	274	24			
			25	276				

* tam sayıya yuvarlanmıştır

** Biotype DNA havuzunda "merdiven dışı" alleller, GeneMapper® ID yazılımı için asıl Biotype şablon dosyalar ile tahsis edilmiştir.

Daha fazla allel incelemek için Diğerleri bölümüne bakın: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm

† Daha iyi bir yönlendirme sağlamak için bu alleller, Allel merdiveni içinde vurgulanmıştır.

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.

Donör / alıcı DNA oranının otomatik olarak hesaplanması ve aynı zamanda standart sapmalar ve tespit limitleri, bir parça boyutu analizinin ham verilerinden doğrudan elde edilebilir.

Mentype® **Chimera**® ile elde edilen sonuçlar sitolojik analizlerden elde edilen sonuçlar ile uyumlu hale getirilecek ise sitolojik analizlerin en az 500 lökosit ile yapıldığından emin olun.

Pull-up pikleri

Pull-up pikleri, doğrusal tespit aralığının 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.

Stutter pikleri

Stutter piklerinin oluşması tekrarlı yapıya sekansına ve allel sayısına bağlıdır. Tetranükleotid STR motiflerinin amplifikasyonu sırasında Taq DNA polimerazının kayma etkilerinden dolayı tekrarlı birimi kaybolursa, N-4 pikleri oluşur. Bu piklerin yorumlanması, GeneMapper® ID/ID-X yazılımı şablon dosyalarına uygun olarak yapılmalıdır.

Şablondan bağımsız olarak nükleotid eklenmesi

Terminal transferaz aktivitesi nedeniyle, Multi Taq 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 aza 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 etkilenir. 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® **Chimera**® kiti, 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. Nüfusların genetik verileri

STR markörlerinin en önemli nüfus genetik verileri tablo 13-16'da listelenmiştir. Hesaplamak için ilgili formüller, Botstein ve ark. (1980) tarafından yayınlanan **Polymorphism Information Content** (PIC), *Nei and Roychoudhury ve ark. (1974)* tarafından yayınlanan **Expected Heterozygosity** (HET) ve *Jones ve ark. (1972)* tarafından yayınlanan **Power of Discrimination** (PD)'dan alınmıştır. Formüllerin tamamı, otozomal markörler için uygundur.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n f_i^2 f_j^2$$

$$HET = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^K f_j^2 \right)$$

$$PD = 1 - \sum_i f_i^2$$

Tablo 13. Nüfusların genetik verileri

Markör D2S1360		Markör D3S1744		Markör D4S2366	
Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı
19	0.007	13	0.007	9	0.347
20	0.126	14	0.104	10	0.179
21	0.060	15	0.053	11	0.074
22	0.309	16	0.100	12	0.147
23	0.142	17	0.319	13	0.168
24	0.098	18	0.197	14	0.074
25	0.086	19	0.130	15	0.011
26	0.093	20	0.067		
27	0.035	21	0.023		
28	0.023				
29	0.012	PIC	0.790	PIC	0.760
30	0.002	PD	0.943	PD	0.919
31	0.005	HET	0.792	HET	0.795
32	0.002				
PIC	0.820				
PD	0.955				
HET	0.856				

Tablo 14. Nüfusların genetik verileri

Markör D5S2500		Markör D6S474		Markör D7S1517	
Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı
9	0.007	13	0.246	16	0.007
10	0.084	14	0.212	17	0.007
11	0.313	15	0.154	18	0.049
12	0.161	16	0.285	19	0.120
13	0.061	17	0.097	20	0.101
14	0.042	18	0.005	21	0.099
15	0.213			22	0.082
16	0.103	PIC	0.740	23	0.077
17	0.009	PD	0.918	24	0.155
18	0.007	HET	0.733	25	0.230
				26	0.054
PIC	0.780			27	0.014
PD	0.938			28	0.005
HET	0.804				
				PIC	0.860
				PD	0.967
				HET	0.826

Tablo 15. Nüfusların genetik verileri

Markör D8S1132		Markör D10S2325		Markör D12S391	
Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı
16	0.007	6	0.002	15	0.035
17	0.095	7	0.102	16	0.019
18	0.221	8	0.056	17	0.107
19	0.153	9	0.121	17.3	0.019
20	0.128	10	0.142	18	0.215
21	0.119	11	0.144	18.3	0.007
22	0.133	12	0.193	19	0.121
23	0.077	13	0.133	19.3	0.016
24	0.056	14	0.065	20	0.117
25	0.005	15	0.037	21	0.093
26	0.005	16	0.005	22	0.114
27	0.002			23	0.072
		PIC	0.860	24	0.040
PIC	0.850	PD	0.967	25	0.021
PD	0.964	HET	0.851	26	0.002
HET	0.828				
				PIC	0.870
				PD	0.971
				HET	0.893

Tablo 16. Nüfusların genetik verileri

Markör D18S51		Markör D21S2055		Markör SE33 (ACTBP2)	
Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı	Allel	Allel sıklığı
10	0.005	16.1	0.056	11	0.002
12	0.103	17.1	0.021	12	0.014
13	0.110	18.1	0.023	13	0.002
14	0.157	19.1	0.274	13.2	0.002
15	0.199	20.1	0.040	14	0.026
16	0.161	21.1	0.019	15	0.049
17	0.112	22.1	0.005	16	0.047
18	0.072	23	0.007	17	0.070
19	0.028	25	0.112	17.3	0.002
20	0.030	26	0.116	18	0.044
21	0.021	27	0.016	18.3	0.002
24	0.002	28	0.007	19	0.082
		29	0.030	19.2	0.009
PIC	0.850	30	0.021	20	0.044
PD	0.964	31	0.023	20.2	0.009
HET	0.902	32	0.026	21	0.035
		33	0.067	21.2	0.019
		34	0.074	22	0.007
		35	0.053	22.2	0.035
		36	0.007	23.2	0.023
		37	0.002	24	0.002
				24.2	0.035
		PIC	0.870	25.2	0.044
		PD	0.971	26.2	0.040
		HET	0.856	27.2	0.084
				28.2	0.084
				29.2	0.051
				30	0.002
				30.2	0.061
				31.2	0.028
				32.2	0.023
				33	0.009
				33.2	0.005
				34	0.002
				36	0.002
				PIC	0.950
				PD	0.990
				HET	0.949

Nüfusların genetik verilerinin tamamı ca analizine dayanmaktadır. 210 bağlantısız Avrupa analizi, Biotype GmbH tarafından gerçekleştirilmiştir.

7. Referanslar

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997) DNA Recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110:175-176.

Becker D, Vogelsang D, Brabetz W (2007) Population data on the seven short tandem repeat loci D4S2366, D6S474, D14S608, D19S246, D20S480, D21S226 and D22S689 in a German population. *Int J Legal Med* 121:78-81.

Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331.

Hering S, Müller E (2001) New allele and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci Int* 124:187-191.

Jones DA (1972) Blood samples: Probability of Discrimination. *J Forensic Sci Soc* 12:355-359.

Nei M, Roychoudhury AK (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379–390.

Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Cali F, Romano V, Michael M (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci Int* 138: 37-43.

Wiegand P, Lareu M. V., Schürenkamp M (1999) D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int J Legal Med* 112:360-363.

Wiegand P, Klintschar M (2002) Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *Int J Legal Med* 116:258-261.

8. 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-TANI



Işıktan koruyun



Kuru muhafaza edin

Mentype® Chimera® PCR-Amplifikasyon Kiti

Teknik Özellikleri:

A Analitik doğrulama

A a) Standart reaksiyon ve partiye özgü toleransın belirlenmesi

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 çoğu STR sisteminde heterozigot olan Kontrol DNA'sını içerir. Standart reaksiyon, 500 pg'lik nominal konsantrasyonda Kontrol DNA'sı ile dörtlü belirmelerde gerçekleştirilmiştir. DNA'sız dört boş değer (şablon kontrolü olmayan, NTC) ek olarak uygulanmıştır.

Sonuçlar: PCR primerlerinin partiye özgü karışımları için aşağıdaki özellikler belirlenmiştir: ABI PRISM® 310 Genetik Analizör kullanılarak 1 000-4 000 RFU sinyal yükseklikleri ve ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör kullanılarak 1 000-5 000 RFU sinyal yükseklikleri. Heterozigot sistemlerin sinyal yüksekliklerindeki dalgalanmalar, rehber değerinin % 30'unu geçmemelidir. Ölçekleme aralığında, boş değerler için spesifik olmayan sinyaller ≥ 50 RFU (taban çizgi) gözlemlenmemiştir.

A b) Genotipleme doğruluğu

Amaç: Allel tahsisinin doğruluğu standart koşullar altında istatistiksel olarak kanıtlanmalıdır. Test, Allel merdiveni kullanılarak otomatik allel çağrısının doğruluğunu ve 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 belirmelerde, farklı kaynaklardan alınan (tam kan, yanak smear) 80 adet ön tiplmeli insan DNA'sı test edilmiştir. Buna ek olarak boş bir test de (DNA olmayan) yapılmıştır. Kabul kriterleri, ≥ 50 RFU pik yüksekliğe sahip tam profiller olarak tanımlanmıştır (manuel değerlendirme).

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

A c) 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 d) Analitik hassasiyet (sensitivite)

Amaç: Analitik tespit sınırının belirlenmesi (sensitivite).

Yöntem: 500 pg ila 31,5 pg referans DNA içeren bir seyreltik serisi, dörtlü gruplar halinde test edilmiştir. Kabul kriteri olarak ≥ 200 RFU olan komple DNA profilleri tanımlanmıştır.

Sonuçlar: 200 pg genomik DNA tespit limiti belirlenmiştir.

A e) Farklı PCR ısı döngüleyiciler ile tahlil performansı

Amaç: Farklı üreticilere ait PCR ısı döngüleyicilerin teknik özellikleri de farklı olmaktadır. Özellikle farklı ısıtma ve soğutma oranları ile farklı sıcaklık kontrol teknikleri gözlemlenebilmektedir.

Yöntem: Aynı temel karışım ve 2 boş numune (DNA olmayan) ile dörtlü gruplar halinde şu ısı döngüleyiciler kullanılarak, 500 pg nominal konsantrasyondaki Kontrol DNA ile standart reaksiyonun test edilmesi: Thermocycler *GeneAmp 9700* with Alu-block (Life Technologies, Division Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), *GeneAmp 9700* with Silver-block (Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt), DNA Engine (PTC-200) Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *Biometra T1* (Biometra GmbH, Göttingen), *Techné® TC-512 Thermal Cycler* (biostep GmbH, Jahnsdorf) ve *Eppendorf Mastercycler ep-S* (Eppendorf AG, Hamburg).

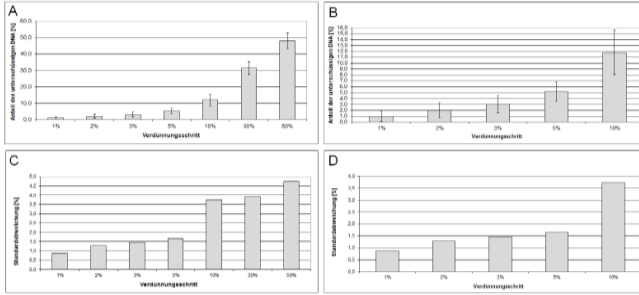
Sonuçlar: Spesifik bir yan ürün ≥ 200 RFU tespit edilmemiştir. Standart reaksiyona kıyasla ortalama pik yüksekliğinden sapma, 2 °C/saniye tanımlı artışta % 20'dir.

A f) Karma DNA numuneleri

Amaç: Allojenik kan kök hücre transplantasyonu sonrası kimerizm analizin 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.

Yöntem: % 0, % 1, % 2, % 3, % 5, % 10, % 30 ve % 50 şeklinde eksik DNA kullanılarak iki DNA'nın üç bağımsız karışımı hazırlanmıştır. Karışımlardaki DNA'lar, dört bilgilendirici allel bulunan en az üç STR lokusunu göstermiştir. Her bir durumda dört paralel karışımdaki 1 ng DNA karışımı, standart reaksiyon tarzında test edilmiştir. En az 50 RFU değerindeki sinyal yükseklikleri değerlendirilmiştir.

Sonuçlar: Sonuçlar Şekil 4'te gösterilmiştir. Eksik DNA için % 1 tespit sınırına ulaşılabilir. Bu da kimerizm analizlerinde kullanıldığı zaman, konvansiyonel, adli STR kiti ile elde edilen % 1-5 değere karşılık gelmektedir.



Şekil 4: DNA karışımları testi. (A, B) Kılcal elektroforez sinyal yüksekliklerinden hesaplanan eksik DNA parçalarının ortalama değerleri ve standart sapmaları (C, D), A'dan B'ye standart sapma.

A g) 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 için allel sinyal başarısızlığı < 200 RFU saptanmamıştır.

A h) PCR tampon partilerdeki dalgalanma

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 500 ng nominal konsantrasyon ile standart reaksiyondaki performansını görmek için üç bağımsız reaksiyon karışımı A partisi test edilmiştir.

Sonuçlar: Spesifik olmayan bir yan ürün ≥ 50 RFU tespit edilmemiştir. Standart reaksiyona kıyasla, ortalama pik yükseklikler standart reaksiyondan en fazla % 20 sapmıştır.

A i) PCR inhibitörleri

Amaç: Hemoglobin kaynaklı hematin, DNA saflaştırması sırasında stabilize edilmiş tam kandan tamamen giderilmez ise, Taq DNA polimerazının güçlü bir inhibitörüdür.

Yöntem: *Hematin porcine* (Sigma-Aldrich, Freiburg) etkisi, Kontrol DNA ve 500 ng nominal konsantrasyon ile standart reaksiyonda, 0-250 μM nihai konsantrasyonda test edilmiştir.

Sonuçlar: Komple profillere (≥ 50 RFU) 100 μM *hematin porcine* inhibitör son konsantrasyonuna ulaşılmıştır. 150 μM 'lik bir nihai konsantrasyon için, tam profiller elde edilememiştir (sadece kısmi profiller).

A j) 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 sapması en fazla % 20'dir (özellikle sinyal kaybı). Boş değerler için ölçekleme aralığında ek pikler > 50 RFU bulunmamıştır.

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

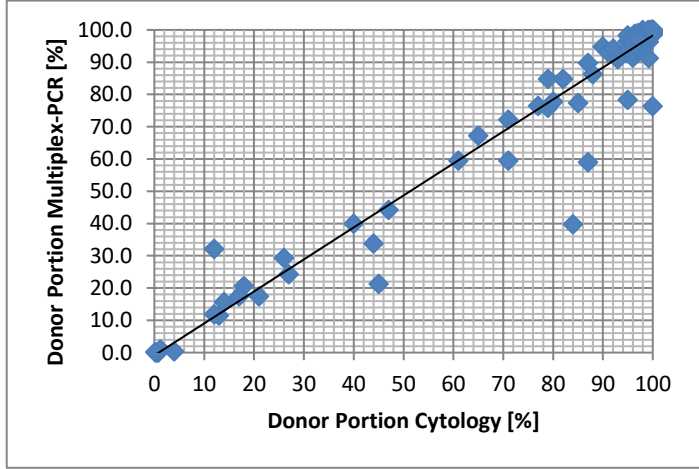
Yerinde hibridizasyon ile flüoresan kullanılarak (FISH) donör ve alıcı lökositlerin sitogenetik farklılaşması, kıyaslama için bir test olarak kullanılmıştır. Cinsiyet kromozomuna özgü CE-IVD CEP® X SpectrumOrange™ / Y SpectrumGreen™ Doğrudan Etiketli Floresan DNA Prob Kiti (Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır.

B c) DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması

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

B d) Sonuçlar

Allojenik kan kök hücresi ya da kemik iliği nakli sonrası farklı günlerde, toplam 103 veri seti yetişkin hastalardan toplanmıştır. Donör-alıcı çiftleri genetik cinsiyet açısından farklılık göstermektedir ve bu nedenle cinsiyet kromozomuna özgü FISH için uygun bulunmuştur. 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 sinyal yüksekliklerinin ortalama değerleri kullanılmıştır (en az 2). Uyumluluk analizi sonuçları, Şekil 5'te özetlenmiştir.



Şekil 5: Sitolojiye kıyasla çok katmanlı PCR uygunluk analizi.

103 veri setinin 92'sinde (% 90.3) çok katmanlı PCR'den gelen sonuçların sapması % 5'ten azdır. Daha büyük sapmalar sadece toplam hücre sayısının 500 veya daha az olduğu sitogenetik bulgularda gözlenmiştir. FISH-kit üreticisinin tavsiyelerine göre, en az 200 hücre sayılmalıdır. Ancak uygulama önerilerine göre, daha yüksek mutlak hücre sayıları (500-1 000), daha iyi sitogenetik sonuçlar vermektedir [1, 2].

B e) Referanslar

- 1) **Thiede C.** Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. Am J Pharmacogenomics 2004; 4: 177-87.
- 2) **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