

Juni 2015

Investigator[®] ESSplex SE QS Handbuch

Für die Multiplex-Amplifikation der Loci
des europäischen Standardsatzes
(ESS, European Standard Set)
zuzüglich SE33 und Amelogenin

Making improvements in life possible[®]

Inhalt

Kit-Inhalt	4
Lagerung	5
Verwendungszweck	5
Sicherheitshinweise.....	6
Qualitätskontrolle.....	6
Einleitung.....	7
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	10
Protokoll: PCR-Amplifikation	12
Protokoll: Elektrophorese mit dem ABI PRISM 3100- <i>Avant</i> /3100 Genetic Analyzer	15
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung	16
Probenvorbereitung	20
Einrichten der GeneScan-Software.....	21
Analyseparameter	24
Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3130/3130x/ Genetic Analyzer	25
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung	26
Probenvorbereitung	30
Einrichten der Data Collection Software	31
Analyseparameter/Analysemethode	35
Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer....	36
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung	37
Vorbereiten der Standardkalibrierplatte für 8 Kapillaren (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)	38

Vorbereiten der Standardkalibrierplatte für 24 Kapillaren (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)	39
Zusammenstellen der Platte und Laden der Platte in das Gerät	39
Probenvorbereitung	44
Analyseparameter/Analysemethode	52
Protokoll: Analyse	53
Analysesoftware	53
Kontrollen	55
Qualitätssensor	56
Fehlerbehebung	62
Literatur	65
Anhang: Interpretation der Ergebnisse	66
Bestellinformationen	68

Kit-Inhalt

Investigator ESSplex SE QS Kit	(100)	(400)
Katalog-Nr.	381575	381577
Anzahl der 25-µl-Reaktionen	100	400
Fast Reaction Mix 2.0 (Schnellreaktionsgemisch 2.0)*	750 µl	4 × 750 µl
Primer Mix ESSplex SE QS (ESSplex SE QS Primer-Gemisch)	250 µl	4 × 250 µl
Nuclease-free water (nukleasefreies Wasser)	1,9 ml	4 × 1,9 ml
Control DNA 9948 (Kontroll-DNA 9948) (0,1 ng/µl)	200 µl	200 µl
DNA size standard 550 (DNA-Größenstandard 550) (BTO)	55 µl	220 µl
Allelic ladder ESSplex SE QS (ESSplex SE QS Allelleiter)	25 µl	3 × 25 µl

* Enthält DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Rinderserumalbumin (BSA).

Lagerung

Das Investigator ESSplex SE QS Kit wird auf Trockeneis ausgeliefert. Er muss unmittelbar nach dem Empfang bei -15 bis $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Das Primer-Gemisch und die Allelleiter müssen lichtgeschützt gelagert werden. DNA-Proben und Post-PCR-Reagenzien (Allelleiter und DNA-Größenstandard) sind von den PCR-Reagenzien getrennt zu lagern. Die Komponenten sind unter diesen Bedingungen bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum stabil.

Das Investigator ESSplex SE QS Kit kann nach dem Öffnen maximal sechs Monate bei 2 bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden oder erneut eingefroren und in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur für längere Zeiträume bei -15 bis $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Verwendungszweck

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist für molekularbiologische Anwendungen in der Gerichtsmedizin, zur Identifizierung von Menschen und für Vaterschaftstests vorgesehen. Dieses Produkt ist nicht zur Diagnose, Prävention oder Therapie einer Erkrankung vorgesehen.

Bei der Handhabung der Produkte ist mit angemessener Vorsicht und Aufmerksamkeit vorzugehen. Wir empfehlen allen Anwendern von QIAGEN-Produkten, die für die Analyse von rekombinanter DNA entwickelten NIH-Leitlinien oder andere relevante Leitlinien zu befolgen.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und KitKomponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.



VORSICHT: Es dürfen KEINE Bleichlösungen oder saure Lösungen direkt zum Probenvorbereitungsabfall zugegeben werden.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des Investigator ESSplex SE QS Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Einleitung

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist für Multiplex-PCR-Anwendungen in der Gerichtsmedizin, zur Identifizierung von Menschen und für Vaterschaftstests vorgesehen. Die 16 polymorphen STR-Marker, die vom ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) und der EDNAP (European DNA Profiling Group) als neuer Standardsatz empfohlen wurden (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11] und vWA), sowie SE33 [ACTBP2] und das geschlechtsspezifische Amelogenin werden gleichzeitig amplifiziert.

Das Primer-Gemisch des Investigator ESSplex SE QS Kits enthält zwei innovative interne PCR-Kontrollen (Qualitätssensor QS1 und QS2), die hilfreiche Informationen über die Effizienz der PCR und die Gegenwart von PCR-Inhibitoren liefern. Die Qualitätssensoren werden zeitgleich mit den polymorphen STR-Markern amplifiziert.

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist speziell für die schnelle und zuverlässige Erstellung von DNA-Profilen aus Blut, Wangenabstrichen und forensischen Spuren vorgesehen. Das Kit beruht auf PCR-Technologie mit hoher Zyklusgeschwindigkeit von QIAGEN, mit der die Amplifikation in ungefähr 60 Minuten abgeschlossen werden kann. Er liefert extrem robuste Ergebnisse mit einer Chemie, die gegenüber von Inhibitoren beständig ist. Die Primer sind mit den folgenden Farbstoffen fluoreszenzmarkiert:

- 6-FAM™: QS1, Amelogenin, TH01, D3S1358, vWA, D21S11, QS2
- BTG: D16S539, D1S1656, D19S433, SE33
- BTY: D10S1248, D22S1045, D12S391, D8S1179, D2S1338
- BTR: D2S441, D18S51, FGA

Die unter Standardbedingungen empfohlene DNA-Menge beträgt 0,5 ng. Interne Validierungen haben gezeigt, dass mit 0,2–2 ng DNA robuste und ausgeglichene Ergebnisse und mit < 0,1 ng DNA zuverlässige Ergebnisse erhalten werden.

Das Investigator ESSplex SE QS Kit wurde mit dem GeneAmp® PCR System 9700 (mit goldbeschichtetem 96-Well-Silberblock) und dem Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer validiert.

Tabelle 1 zeigt die STR-Loci mit dem zugehörigen Chromosomen-Mapping und den Repeat-Motiven, die den Vorgaben der ISFG (International Society for Forensic Genetics) für den Gebrauch von Mikrosatelliten-Markern (Bär et al., 1997) entsprechen.

Weitere Informationen zu den Mikrovarianten, die nicht in der Investigator ESSplex SE QS Allelleiter enthalten sind, finden Sie auf der Website des NIST (National Institute of Standards and Technology, www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/).

Tabelle 1. Locus-spezifische Informationen zum Investigator ESSplex SE QS Kit

Locus	GenBank®-Eintragsnummer	Repeat-Motiv des Referenzallels	Chromosomen-Mapping
Amelogenin X	M55418	–	Xp22.1–22.3
Amelogenin Y	M55419	–	Yp11.2
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] ₁₆ [TGA] [TAGA] [TAGG] ₁ [TG] ₅	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] ₁₂	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	3p25.3
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	8q23.1–23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] ₁₃	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	12p13.2
D16S539	G07925	[GATA] ₁₁	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] ₁₁	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	22q12.3
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] ₃ TTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] ₉	11p15.5
vWA	M25858	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	12p13.31

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

Alle Protokolle

- Hi-Di™-Formamid, 25 ml (Applied Biosystems, Katalog-Nr. 4311320)
- Matrixstandards BT5 für Mehrkapillargeräte, z. B. ABI PRISM 3100 und Applied Biosystems 3130 und 3500 Genetic Analyzers (QIAGEN-Katalog-Nr. 386123 oder 386125)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Einer der folgenden DNA-Analyzer:*
 - ABI PRISM 3100-Avant™/3100 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
- Einer der folgenden PCR-Thermocycler:*
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Biometra UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- PCR-Röhrchen oder -Platten
- Mikrozentrifuge für PCR-Röhrchen oder -Platten

* Diese Liste der Anbieter ist nicht vollständig; viele wichtige Anbieter von biologischen Materialien sind in dieser Liste nicht enthalten.

Software zur Validitätsanalyse für Produkte zur Humanidentifizierung

Investigator-PCR-Kits zur Humanidentifizierung müssen mit einer Allelleiter kalibriert werden. Die verwendete Software muss daher mit Produkten zur Humanidentifizierung in forensischen Anwendungen kompatibel sein. Wir empfehlen GeneMapper® ID-X. Die Investigator-Vorlagedateien ermöglichen die Durchführung einer Datenanalyse und sind mit dieser Software kompatibel.

Protokoll: PCR-Amplifikation

Dieses Protokoll ist für die PCR-Amplifikation von STR-Loci aus forensischen Proben mit dem Investigator ESSplex SE QS Kit vorgesehen.

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Bereiten Sie alle Reaktionsgemische in einem Bereich vor, der von den Bereichen für die DNA-Isolierung und die Analyse der PCR-Produkte (Post-PCR-Analyse) getrennt ist.
- Verwenden Sie zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen Einwegspritzen mit hydrophoben Filtern.
- Die unter Standardbedingungen empfohlene DNA-Menge beträgt 0,5 ng. Interne Validierungen haben gezeigt, dass mit 0,2–2 ng DNA robuste und ausgeglichene Ergebnisse und mit < 0,1 ng DNA zuverlässige Ergebnisse erhalten werden.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Bevor Sie die Röhrchen mit den PCR-Komponenten öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.

Verfahren

1. Tauen Sie die PCR-Komponenten und die Template-Nukleinsäure auf.
Mischen Sie gründlich. Zentrifugieren Sie vor dem Gebrauch kurz.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 2 ein Master-Mix her.
Stellen Sie den Mix mit zusätzlichen Reaktionen her, da beim Überführen ein gewisser Reagenzverlust auftreten kann. Schließen Sie auch Positiv- und Negativkontrollreaktionen ein. Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Template-DNA (Probe) und des nuklease-freien Wassers alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.
3. Mischen Sie den Master-Mix gründlich, zentrifugieren Sie kurz und geben Sie geeignete Volumina in die PCR-Röhrchen oder die Wells einer PCR-Platte.

4. Geben Sie Template-DNA und nukleasefreies Wasser zum Master-Mix zu, um ein endgültiges Probenvolumen von 25 µl zu erhalten.

5. Stellen Sie Positiv- und Negativkontrollen her.

Positivkontrolle: Verwenden Sie 5 µl der Kontroll-DNA (d. h. 500 pg).

Negativkontrolle: Verwenden Sie in der Reaktion anstelle von Template-DNA nukleasefreies Wasser.

Tabelle 2. Zusammensetzung des Master-Mixes

Komponente	Volumen pro Reaktion
Schnellreaktionsgemisch 2.0	7,5 µl
Primer-Gemisch	2,5 µl
Nukleasefreies Wasser (Zugabe in Schritt 4)	Variabel
Template-DNA (Zugabe in Schritt 4)	Variabel
Gesamtvolumen	25 µl

6. Wenn Template-DNA auf den Rand oder den Deckel des PCR-Röhrchens pipettiert wurde, zentrifugieren Sie kurz, um den Inhalt unten im Röhrchen zu sammeln.

7. Programmieren Sie den Thermocycler gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Parameter.

Hinweis: Wenn Sie mit dem GeneAmp PCR System 9700 mit einem Aluminiumblock arbeiten, verwenden Sie „Std Mode“ (Standardmodus); bei Verwendung eines 96-Well-Blocks aus Silber oder eines 96-Well-Blocks aus goldbeschichtetem Silber verwenden Sie „Max Mode“ (Max. Modus). Verwenden Sie nicht „9600 Emulation Mode“ (9600 Emulationsmodus).

Tabelle 3. Standard-Zyklusprotokoll, empfohlen für alle DNA-Proben

Komponente	Zeit	Anzahl der Zyklen
98 °C*	30 Sek.	3 Zyklen
64 °C	55 Sek.	
72 °C	5 Sek.	
96 °C	10 Sek.	27 Zyklen
61 °C	55 Sek.	
72 °C	5 Sek.	
68 °C	2 min	
10 °C	∞	–

* HotStart zur Aktivierung der DNA-Polymerase.

8. Lagern Sie die Proben nach der Durchführung des Zyklusprotokolls lichtgeschützt bei –15 bis –30 °C oder fahren Sie direkt mit der Elektrophorese fort.

Protokoll: Elektrophorese mit dem ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Detaillierte Anweisungen zur Systemeinrichtung, spektralen Kalibrierung und Anwendung der ABI PRISM 3100 Data Collection Software, Version 1.01 oder 1.1, und der GeneScan® Software finden Sie im *ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual* (ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer Benutzerhandbuch).

Der ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer hat 4 Kapillaren und der ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 16 Kapillaren.

Für die kombinierte Anwendung der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz G5 verwendet. Dieser Matrixstandard wird als BT5 bezeichnet.

Die für die Elektrophorese benötigten Materialien sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Für die Elektrophorese benötigte Materialien

Material	Spezifikationen
Kapillare	36-cm-Kapillar-Array für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Polymer	POP-4™-Polymer für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Puffer	10fach-Puffer mit EDTA für den Genetic Analyzer

Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung

Für die Untersuchung von Mehrfarbsystemen mit dem ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer ist eine fachgerecht durchgeführte spektrale Kalibrierung von entscheidender Bedeutung. Die spektrale Kalibrierung muss vor der Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden. Bei der Kalibrierung wird eine Matrix erzeugt, mit deren Hilfe die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe korrigiert wird.

Die spektrale Kalibrierung besteht aus den folgenden Schritten:

- Herstellen der spektralen Kalibrierstandards
- Laden der Standards auf die 96-Well-Reaktionsplatte (eine Probe pro Kapillare)
- Eingeben der Plattenzusammensetzung
- Durchführen eines spektralen Kalibrierlaufs und Überprüfen der Matrix

Herstellen der spektralen Kalibrierstandards

Beispiel für 4 Kapillaren (ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer)

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 5 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 5. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 4 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	60 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	5 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, z. B. Positionen A1–D1.
3. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
4. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**

Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Beispiel für 16 Kapillaren (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer)

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 6 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 6. Herstellung von Gemischen aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 16 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	204 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	17 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, z. B. Positionen A1–H1 und A2–H2.
3. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
4. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**
Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Durchführen eines spektralen Kalibrierlaufs

Um mit der Data Collection Software, Version 1.0.1 oder 1.1, eine Kalibrierung durchzuführen, muss die Parameterdatei für DyeSetG5 einmalig geändert werden.

Spektraler Parameter

1. Um die Einstellungen in der Parameterdatei zu ändern, gehen Sie zum folgenden Pfad:
D:\AppliedBio\Support Files\Data Collection SupportFiles\CalibrationData\Spectral Calibration\ParamFiles
2. Wählen Sie „MtxSTD{Genescan_SetG5}“ aus, um die PAR-Datei zu öffnen.
3. Ändern Sie „Condition Bounds Range“ (Grenzwerte festlegen) auf [1.0, 20.0].
4. Wenn die Kalibrierung nicht erfolgreich war, ändern Sie auch „Sensitivity“ (Sensitivität) auf 0.1 und „Quality“ (Qualität) auf 0.8.

5. Wählen Sie im Menü „File“ (Datei) die Option „Save As“ (Speichern unter) und speichern Sie die Parameterdatei unter einem neuen Namen, z. B. MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par.

Hinweis: Verwenden Sie beim Arbeiten mit dem QIAGEN-Matrixstandard BT5 immer diese Parameterdatei für spektrale Kalibrierläufe.

Platteneditor für die spektrale Kalibrierung

1. Stellen Sie die 96-Well-Platte auf das Autosampler-Tablett.
2. Starten Sie die ABI PRISM 3100 Data Collection Software.
3. Klicken Sie in der Plattenansicht auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Plate Editor“ (Platteneditor) zu öffnen.
4. Geben Sie für die Platte einen Namen ein.
5. Wählen Sie eine spektrale Kalibrierung aus.
6. Wählen Sie „96-Well“ als Plattentyp aus und klicken Sie auf „Finish“ (Fertig stellen).

Tabelle 7. Platteneditor für die spektrale Kalibrierung

Parameter	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	Einen Namen für die Matrixproben eingeben.
Dye Set (Farbstoffsatz)	G5
Spectral Run Module (Spektrallauf-Modul)	Standard (z. B. Spect36_POP4)
Spectral Parameters (Spektrale Parameter)	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (zuvor erstellte Parameterdatei)

7. Klicken Sie auf den Spaltenkopf, um die gesamte Spalte auszuwählen. Wählen Sie dann im Menü „Edit“ (Bearbeiten) „Fill Down“ (Nach unten ausfüllen) aus, um die Informationen für die ausgewählten Proben zu übernehmen. Klicken Sie zur Bestätigung auf „OK“.
8. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Autosampler-Tablett mit der erstellten Platten-ID und starten Sie den Lauf.

- Überprüfen Sie nach Abschluss des Laufs im Dialogfeld „Spectral Calibration Result“ (Ergebnis der spektralen Kalibrierung), ob alle Kapillaren die Kalibrierung bestanden haben (Kennzeichnung A).

Wenn einzelne Kapillaren mit X gekennzeichnet sind, sehen Sie das *ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual* (PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer Benutzerhandbuch) ein.

- Klicken Sie auf „OK“, um den Abschluss des Laufs zu bestätigen.

Überprüfen der Matrix

- Wählen Sie im Menü „Tools“ (Werkzeuge) die Option „Display Spectral Calibration“ (Spektrale Kalibrierung anzeigen) und dann „Dye Set“ (Farbstoffsatz) und „G5“ aus, um das Profil der spektralen Kalibrierung für jede Kapillare zu überprüfen.
- Der Qualitätswert (Q-Wert) muss über 0,95 liegen und die Konditionszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen. Beide Werte müssen im zulässigen Bereich liegen.
- Überprüfen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. In jeder Matrixprobe sollten 5 Peaks mit Höhen im Bereich von 1000–5000 RFU vorhanden sein.

Hinweis: Der optimale Bereich beträgt 2000–4000 RFU.

- Überprüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Mit der neuen Matrix dürfen zwischen den Farbpanels (B, G, Y, R und O) keine Pull-up-Peaks auftreten.
- Wird die Kalibrierung nicht bestanden, befolgen Sie die Anweisungen im Abschnitt „Spektraler Parameter“ auf Seite 17.
- Wenn alle Kapillaren die Kalibrierung bestanden haben, muss die letzte Kalibrierdatei für Farbstoffsatz G5 manuell aktiviert werden. Klicken Sie im Menü „Tools“ (Werkzeuge) auf „Set Active Spectral Calibration“ (Spektrale Kalibrierung aktivieren).
- Benennen Sie die Kalibrierdatei unter „Set Matrix Name“ (Matrixname festlegen) um (z. B. BT5_Datum der Kalibrierung).

Probenvorbereitung

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 1 ein Gemisch aus Formamid und DNA-Größenstandard her.

Tabelle 8. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und DNA-Größenstandard

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	12 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	0,5 µl

2. Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12 µl des Gemisches in ein Röhrchen.
3. Geben Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter zu (bei Bedarf verdünnt).
4. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
5. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**

Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

6. Stellen Sie die Proben auf das Tablett.

Da die Injektionen in allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen auf die Platte eines Mehrkapillargeräts 4 oder 16 Proben pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden sollen, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di-Formamid gefüllt werden.

Um auf Mehrkapillargeräten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, müssen mehrere Leitern analysiert werden.

Die Raumtemperatur hat bei Mehrkapillargeräten einen Einfluss auf die Leistung der PCR-Produkte, so dass insbesondere bei niedrigen Temperaturen Schulterpeaks oder gesplittete Peaks auftreten. Stellen Sie sicher, dass die vom Gerätehersteller empfohlenen Umgebungsbedingungen eingehalten werden.

Einrichten der GeneScan-Software

1. Bearbeiten Sie für den ersten Lauf das Standardlaufmodul für Farbstoffsatz G5. Diese Bearbeitung muss nur einmal durchgeführt werden. Wählen Sie „Module Editor“ (Moduleditor) aus, um das Dialogfeld zu öffnen.
2. Wählen Sie aus der Tabelle „GeneScan“ das gewünschte Laufmodul als Vorlage aus (siehe Tabelle 9).
3. Ändern Sie „Injection Voltage“ (Injektionsspannung) auf 2.5 kV, „Injection Time“ auf 30 s, „Run Voltage“ (Laufspannung) auf 13 kV und „Run Time“ (Laufzeit) auf 30 min.
4. Klicken Sie auf „Save As“ (Speichern unter) und geben Sie den Namen des neuen Moduls ein (z. B. 2.5kV_30s_500bp). Klicken Sie zur Bestätigung auf „OK“.
5. Klicken Sie auf „Close“ (Schließen), um den Laufmoduleditor zu schließen.

Tabelle 9. Laufmodul „2.5kV_30s_500bp“ für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Parameter	Einstellungen
Run Temperature (Lauftemperatur, °C)	Standard
Cap Fill Volume (Kappenfüllvolumen)	Standard
Maximum Current (maximaler Strom, A)	Standard
Current Tolerance (Stromtoleranz, A)	Standard
Run Current (Laufstrom, A)	Standard
Voltage Tolerance (Spannungstoleranz, kV)	Standard
Pre-Run Voltage (Spannung vor Lauf, kV)	Standard
Pre-Run Time (Zeit vor Lauf, s)	Standard
Injection Voltage (Injektionsspannung, kV)	2,5
Injection Time (Injektionszeit, s)	30*
Run Voltage (Laufspannung, kV)	13
Number of Steps (Anzahl Schritte)	Standard
Voltage Step Interval (Intervall Spannungsschritt)	Standard
Data Delay Time (Wartezeit Daten, s)	Standard
Run Time (Laufzeit, min)	30†

* Wenn Sie von den Standardeinstellungen abweichen, kann die Injektionszeit je nach Probentyp zwischen 1 und 35 s betragen. Wenn Proben mit einer sehr hohen Signalintensität aufgezeichnet werden, können kürzere Injektionszeiten verwendet werden. Für Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt kann eine Injektionszeit von bis zu 35 s erforderlich sein.

† Die Laufzeit für Investigator ESSplex SE QS wurde geändert, damit Fragmente bis zu einer Länge von 500 bp analysiert werden können.

Starten des Laufs

1. Stellen Sie die vorbereitete 96-Well-Platte auf das Autosampler-Tablett.
2. Starten Sie die ABI PRISM 3100 Data Collection Software.
3. Klicken Sie in der Plattenansicht auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Plate Editor“ (Platteneditor) zu öffnen.
4. Geben Sie für die Platte einen Namen ein.
5. Wählen Sie „GeneScan“ als Anwendungstyp aus.

6. Wählen Sie „96-Well“ als Plattentyp aus und klicken Sie auf „Finish“ (Fertig stellen).

Tabelle 10. Einstellungen im Plattenditor

Parameter	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	Einen Namen für die Matrixproben eingeben.
Dyes (Farbstoffe)	O
Color Info (Farbinfo)	Leiter oder Probe
Project Name (Projektname)	Z. B. 3100_Projekt1
Dye Set (Farbstoffsatz)	G5
Run Module (Laufmodul)	2.5kV_30s_500bp*
Analysis Module 1 (Analysemodul 1)	DefaultAnalysis.gsp

* Siehe Tabelle 9, „Laufmodul „2.5kV_30s_500bp“ für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer“.

7. Füllen Sie die Tabelle im Plattenditor aus und klicken Sie auf „OK“.
8. Klicken Sie auf den Spaltenkopf, um die gesamte Spalte zu markieren. Wählen Sie dann im Menü „Edit“ (Bearbeiten) „Fill Down“ (Nach unten ausfüllen) aus, um die Informationen für die ausgewählten Proben zu übernehmen.
9. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Autosampler-Tablett mit der erstellten Platten-ID und starten Sie den Lauf.
10. Nach Abschluss des Laufs zeigen Sie die Daten unter „Color Data“ (Farbdaten) in der Array-Ansicht der 3100 Data Collection Software oder unter „Analyzed Sample Files“ (Analysierte Probendateien) in D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns an.

Analyseparameter

Die empfohlenen Analyseparameter sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11. Empfohlene Analyseparameter für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer

Parameter	Einstellungen
Analysis Range (Analysebereich)	Start: 2000
Stop (Stopp): 10,000	
Data Processing (Datenverarbeitung)	Baseline (Basislinie): Checked (Geprüft) Multi-component (Mehrkomponenten): Checked (Geprüft) Smooth options (Glättungsoptionen): Light (Leicht)
Peak Detection (Peakerkennung)	Peak Amplitude Thresholds (Grenzen Peakamplitude) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. Peak-Halbwertsbreite): 2 pts Polynomial Degree (Grad des Polynoms): 3 Peak Window Size (Größe Peakfenster): 11 pts [†]
Size Call Range (Bereich Größenbestimmung)	Min: 60 Max: 550
Size Call Method (Methode Größenbestimmung)	Local Southern Method
Split Peak Correction (Korrektur Peak-Splitting)	Keine

* Die Grenze der Peakamplitude (Cut-off-Wert) entspricht der MindestPeakhöhe, die von der GeneScan oder GeneMapper ID Software erkannt wird. Die Grenzwerte liegen normalerweise im Bereich von 50–200 RFU und sind vom jeweiligen Labor selbst zu bestimmen. Empfehlung: Die MindestPeakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Untergrundrauschens der Basislinie entsprechen.

† Ausschließlich die Einstellung für „Peak Window Size“ (Größe Peakfenster) unterscheidet sich von den Applied Biosystems-Standardwerten für die Humanidentifizierung.

Hinweis: Weitere Informationen zur Verwendung der empfohlenen Template-Dateien (als Analyseparameter) finden Sie im entsprechenden Investigator Template Files User Guide (Handbuch für Investigator Template-Dateien, GeneMapper ID oder GeneMapper ID-X).

Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer

Detaillierte Anweisungen zur Systemeinrichtung, spektralen Kalibrierung und Anwendung der ABI PRISM Data Collection Software, Version 3.0, und der GeneMapper ID Software finden Sie in der Dokumentation *Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide* (Kurzanleitung für Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers).

Der Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer hat 4 Kapillaren und der Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 16 Kapillaren.

Für die kombinierte Anwendung der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz „Any5Dye“ verwendet. Dieser Matrixstandard wird als BT5 bezeichnet.

Die für die Elektrophorese benötigten Materialien sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Für die Elektrophorese benötigte Materialien

Material	Spezifikationen
Kapillare	36-cm-Kapillar-Array für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Polymer	POP-4-Polymer für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Puffer	10fach-Puffer mit EDTA für den Genetic Analyzer

Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung

Vor der Durchführung der DNA-Fragmentlängenanalyse muss für jeden Analyzer eine spektrale Kalibrierung mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO durchgeführt werden. Bei der Kalibrierung wird eine Matrix erzeugt, mit deren Hilfe die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe korrigiert wird.

Die spektrale Kalibrierung besteht aus den folgenden Schritten:

- Herstellen der spektralen Kalibrierstandards
- Laden der Standards auf die 96-Well-Reaktionsplatte (eine Probe pro Kapillare)
- Erstellen des Geräteprotokolls für die spektrale Kalibrierung (Protokollmanager)
- Festlegen der Plattenzusammensetzung im Platteneditor (Plattenmanager)
- Durchführen eines spektralen Kalibrierlaufs und Überprüfen der Matrix

Herstellen der spektralen Kalibrierstandards

Beispiel für 4 Kapillaren (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer)

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 13 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 13. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 4 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	60 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	5 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, z. B. Positionen A1–D1.
3. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
4. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**

5. Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Beispiel für 16 Kapillaren (Applied Biosystems 3130x/ Genetic Analyzer)

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 14 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 14. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 16 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	204 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	17 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, z. B. Positionen A1–H1 und A2–H2.

3. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.

4. Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.

Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Durchführen des spektralen Kalibrierlaufs

1. Stellen Sie die 96-Well-Platte auf das Autosampler-Tablett.

2. Öffnen Sie im „Protocol Manager“ (Protokollmanager) der Data Collection Software das Fenster „Instrument Protocol“ (Geräteprotokoll).

3. Klicken Sie auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Protocol Editor“ (Protokolleditor) zu öffnen.

4. Geben Sie die Informationen aus Tabelle 15 in das Dialogfeld ein und klicken Sie auf „OK“.

Tabelle 15. Geräteprotokoll für die spektrale Kalibrierung

Protokolleditor	Einstellungen
Name	Benutzerdefiniert (z. B. Spectral36_POP4_BT5)
Type (Typ)	SPECTRAL (SPEKTRAL)
Dye Set (Farbstoffsatz)	Any5Dye
Polymer	Benutzerdefiniert (z. B. POP4)*
Array Length (Array-Länge)	Benutzerdefiniert (z. B. 36 cm)*
Chemistry (Chemie)	Matrix Standard (Matrixstandard)
Run Module (Laufmodul)	Benutzerdefiniert (z. B. Spect36_POP4_1)*

* Je nach Polymertyp und Kapillarlänge

5. Klicken Sie im „Plate Manager“ (Plattenmanager) der Data Collection Software auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „New Plate“ (Neue Platte) zu öffnen.
6. Geben Sie die Informationen aus Tabelle 16 ein und klicken Sie auf „OK“. Es wird automatisch eine neue Tabelle im Platteneditor geöffnet (Tabelle 17).

Tabelle 16. Platteneditor für die spektrale Kalibrierung (I)

Dialogfeld „New Plate“	Einstellungen
Name	z. B. Spectral_BT5_date
Application (Anwendung)	Spectral Calibration (Spektrale Kalibrierung)
Plate Type (Plattentyp)	96-Well
Owner Name (Name Besitzer)/ Operator Name (Name Bediener)	...

Tabelle 17. Platteneditor für die spektrale Kalibrierung (II)

Dialogfeld „New Plate“	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	Einen Namen für die Matrixproben eingeben.
Priority (Priorität)	Z. B. 100
Instrument Protocol 1 (Geräteprotokoll 1)	Spectral36_POP4_BT5 (Einstellung zuvor beschrieben)

7. Klicken Sie auf den Spaltenkopf, um die gesamte Spalte auszuwählen. Wählen Sie dann im Menü „Edit“ (Bearbeiten) „Fill Down“ (Nach unten ausfüllen) aus, um die Informationen für die ausgewählten Proben zu übernehmen. Klicken Sie zur Bestätigung auf „OK“.
8. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Autosampler-Tablett mit der erstellten Platten-ID (Position A oder B) und starten Sie den Lauf.

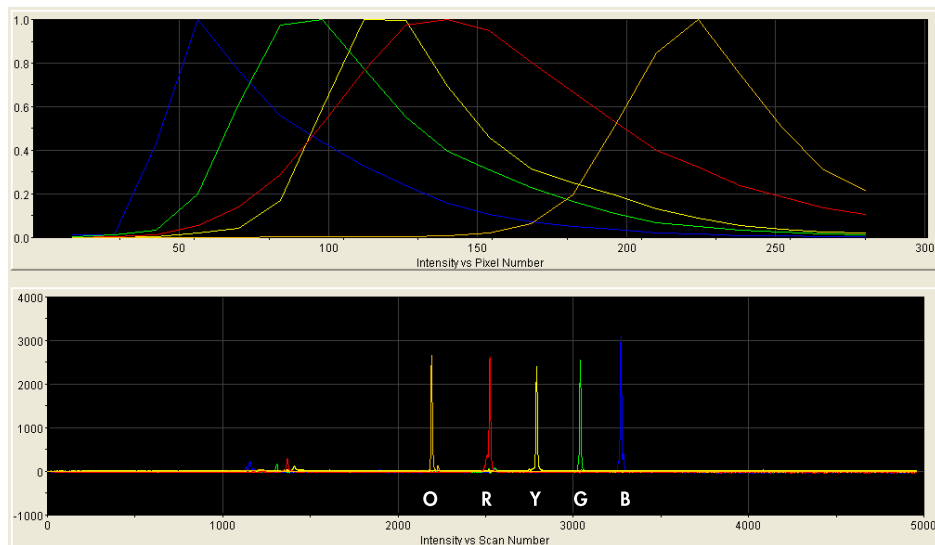


Abbildung 1. Elektropherogramm der spektralen Kalibrierung mit Matrixstandard BT5 auf einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer

Überprüfen der Matrix

1. Der Qualitätswert (Q-Wert) jeder Kapillare muss über 0,95 liegen und die Konditionszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen.
2. Überprüfen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Wie in der Abbildung auf der vorherigen Seite beschrieben, sollten in jeder Matrixprobe 5 Peaks mit Höhen im Bereich von 1000–5000 RFU vorhanden sein.
3. **Hinweis:** Der optimale Bereich beträgt 2000–4000 RFU.
4. Überprüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Mit der neuen Matrix dürfen zwischen den Farbpanels (B, G, Y, R und O) keine Pull-up-Peaks auftreten.

5. Wenn die Kalibrierung nicht bestanden wird, verwenden Sie die optimierten Werte von Matrixstandard BT5 und wiederholen den Kalibrierlauf.
6. Wenn alle Kapillaren die Prüfung bestanden haben, wird die letzte Kalibrierdatei für den Farbstoffsatz „Any5Dye“ im „Spectral Viewer“ (Spektral-Viewer) automatisch aktiviert. Benennen Sie die Kalibrierdatei um (z. B. BT5_Datum der Kalibrierung).

Probenvorbereitung

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 18 ein Gemisch aus Formamid und DNA-Größenstandard her.

Tabelle 18. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und DNA-Größenstandard

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	12,0 µl
DNA-Größenstandard 550 (BTO)	0,5 µl

2. Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12 µl des Gemisches in ein Röhrchen.
3. Geben Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter zu (bei Bedarf verdünnt).
4. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
5. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**
Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.
6. Stellen Sie die Proben auf das Tablett.

Da die Injektionen in allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen auf die Platte eines Mehrkapillargeräts 4 oder 16 Proben pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden sollen, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di-Formamid gefüllt werden.

Um auf Mehrkapillargeräten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, müssen mehrere Leitern analysiert werden.

Die Raumtemperatur hat bei Mehrkapillargeräten einen Einfluss auf die Leistung der PCR-Produkte, so dass insbesondere bei niedrigen Temperaturen Schulterpeaks oder gesplittete Peaks auftreten. Stellen Sie sicher, dass die vom Gerätehersteller empfohlenen Umgebungsbedingungen eingehalten werden.

Einrichten der Data Collection Software

1. Bearbeiten Sie das Laufmodul für den ersten Lauf. Diese Bearbeitung muss nur einmal durchgeführt werden. Klicken Sie im „Module Manager“ (Modulmanager) der Data Collection Software auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Run Module Editor“ (Laufmodul-Editor) zu öffnen.

Hinweis: Ändern Sie die Laufmodul-Standard Einstellungen von „HIDFragmentAnalysis36_POP4_1“ auf die in Tabelle 19 aufgeführten Werte.

2. Ändern Sie „Injection Voltage“ (Injektionsspannung) auf 2.5 kV, „Injection Time“ auf 30 s, „Run Voltage“ (Laufspannung) auf 13 kV und „Run Time“ (Laufzeit) auf 1800 s (siehe Tabelle 19).
3. Klicken Sie auf „Save As“ (Speichern unter), geben Sie für das neue Laufmodul einen Namen ein (z. B. 2.5kV_30s_500bp) und bestätigen Sie durch Klicken auf „OK“.
4. Klicken Sie auf „Close“ (Schließen), um den Laufmoduleditor zu schließen.

Tabelle 19. Laufmodul „2.5kV_30s_500bp“ für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer

Parameter	Einstellungen
Oven Temperature (Ofentemperatur, °C)	Standard
Poly Fill Volume (PolyFüllvolumen)	Standard
Current Stability (Stromstabilität, µA)	Standard
Pre-Run Voltage (Spannung vor Lauf, kV)	Standard
Pre-Run Time (Zeit vor Lauf, s)	Standard
Injection Voltage (Injektionsspannung, kV)	2,5
Injection Time (Injektionszeit, s)	30*
Voltage Number of Steps (Anzahl Spannungsschritte)	Standard
Voltage Step Interval (Intervall Spannungsschritt)	Standard
Data Delay Time (Wartezeit Daten, s)	Standard
Run Voltage (Laufspannung, kV)	13 kV
Run Time (Laufzeit, s)	1800†

* Wenn Sie von den Standardeinstellungen abweichen, kann die Injektionszeit je nach Probentyp zwischen 1 und 35 s betragen. Wenn Proben mit einer sehr hohen Signalintensität aufgezeichnet werden, können kürzere Injektionszeiten verwendet werden. Für Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt kann eine Injektionszeit von bis zu 35 s erforderlich sein.

† Die Laufzeit wurde für das Investigator ESSplex SE QS Kit geändert, damit Fragmente bis zu einer Länge von 500 bp analysiert werden können.

Starten des Laufs

1. Stellen Sie die vorbereitete 96-Well-Platte auf das Autosampler-Tablett.
2. Öffnen Sie den „Protocol Manager“ (Protokollmanager) der Data Collection Software.
3. Klicken Sie im Fenster „Instrument Protocol“ (Geräteprotokoll) auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Protocol Editor“ (Protokolleditor) zu öffnen. Geben Sie dann die in Tabelle 20 aufgeführten Werte ein.
4. Klicken Sie auf „OK“, um den Protokolleditor zu schließen.

Tabelle 20. Einstellungen im Geräteprotokoll

Protokolleditor	Einstellungen
Name	Run36_POP4_BT5_26min
Type (Typ)	REGULAR (REGULÄR)
Run Module (Laufmodul)	2.5kV_30s_500bp*
Dye Set (Farbstoffsatz)	Any5Dye

* Siehe Tabelle 19, „Laufmodul „2.5kV_30s_500bp“ für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer“.

1. Vor jedem Lauf muss eine Plattendefinition erstellt werden. Klicken Sie im „Plate Manager“ (Plattenmanager) der Data Collection Software auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „New Plate“ (Neue Platte) zu öffnen.
2. Geben Sie die in Tabelle 21 aufgeführten Informationen ein.

Tabelle 21. GeneMapper-Platteneditor (I)

Protokolleditor	Einstellungen
Name	Z. B. Platte_BT5_Datum
Application (Anwendung)	GeneMapper-Anwendung auswählen
Plate Type (Plattentyp)	96-Well
Owner Name (Name Besitzer)/ Operator Name (Name Bediener)	...

3. Klicken Sie auf „OK“ und im Platteneditor wird automatisch eine neue Tabelle geöffnet (siehe Tabelle 22).
4. Klicken Sie auf den Spaltenkopf, um die gesamte Spalte auszuwählen. Wählen Sie dann im Menü „Edit“ (Bearbeiten) „Fill Down“ (Nach unten ausfüllen) aus, um die Informationen für alle ausgewählten Proben zu übernehmen. Klicken Sie auf „OK“.
5. Klicken Sie im „Run Scheduler“ (Laufplaner) auf „Find All“ (Alle suchen) und wählen Sie „Link“ (Verknüpfen) aus, um die Reaktionsplatte auf dem Autosampler-Tablett mit dem neu erstellten Plattendatensatz zu verknüpfen (Position A oder B).

Tabelle 22. GeneMapper-Platteneditor (II)

Parameter	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	Name für die Proben eingeben
Priority (Priorität)	Z. B. 100 (Standard)
Sample Type (Probentyp)	Sample (Probe) oder Allelic Ladder (Alleleiter)
Size Standard (Größenstandard)	Z. B. SST-BTO_60-500bp
Panel	Z. B. ESSplex_SE_QS_Panels
Analysis Method (Analysemethode)	Z. B. Analysis_HID_3130
Snp Set	–
User-defined 1-3 (Benutzerdefiniert 1-3)	–
Results Group 1 (Ergebnisgruppe 1)	Ergebnisgruppe auswählen
Instrument Protocol 1 (Geräteprotokoll 1)	Run36_POP4_BT5_26min (Einstellung zuvor beschrieben)

6. Starten Sie den Lauf.
7. Überprüfen Sie während des Laufs den Fehlerstatus im Ereignisprotokoll oder überprüfen Sie die Qualität der Rohdaten für jede Kapillare im „Capillaries Viewer“ (Kapillar-Viewer) oder „Cap/Array Viewer“ (Kapillar-Array-Viewer).
8. Zeigen Sie die Daten in einer Übersicht unter „Run History“ (Laufhistorie) oder im „Cap/Array Viewer“ (Kapillar-Array-Viewer) der Data Collection Software an.
Die Laufdaten werden im Laufordner der zuvor ausgewählten Ergebnisgruppe gespeichert.

Analyseparameter/Analysemethode

Die empfohlenen Analyseparameter sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23. Empfohlene Einstellungen für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer

Parameter	Einstellungen
Peak Detection Algorithm (PeakerkennungsAlgorithmus)	Advanced (Erweitert)
Ranges (Bereiche)	Analysis (Analyse): Partial Range (Teilbereich) Start Point (Anfangspunkt): 2000; Stop Point (Endpunkt): 10,000 Sizing (Größe): All Sizes (Alle Größen)
Smoothing and Baselining (Glättung und Basislinie)	Smoothing (Glättung): Light (Leicht) Baseline Window (Basislinienfenster): 51 pts
Size Call Method (Methode Größenbestimmung)	Local Southern Method
Peak Detection (Peakerkennung)	Peak Amplitude Thresholds (Grenzen Peakamplitude) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. Peak-Halbwertsbreite): 2 pts Polynomial Degree (Grad des Polynoms): 3 Peak Window Size (Größe Peakfenster): 11 pts† Slope Thresholds (Grenzen Steigung): 0.0

* Die Grenze der Peakamplitude (Cut-off-Wert) entspricht der MindestPeakhöhe, die von der GeneMapper ID oder ID-X Software erkannt wird. Die Grenzwerte liegen normalerweise im Bereich von 50–200 RFU und sind vom jeweiligen Labor selbst zu bestimmen. Empfehlung: Die MindestPeakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Untergrundrauschens der Basislinie entsprechen.

† Ausschließlich die Einstellung für „Peak Window Size“ (Größe Peakfenster) unterscheidet sich von den Applied Biosystems-Standardwerten für die Humanidentifizierung.

Hinweis: Weitere Informationen zur Verwendung der empfohlenen Template-Dateien (als Analyseparameter) finden Sie im entsprechenden Investigator Template Files User Guide (Handbuch für Investigator Template-Dateien, GeneMapper ID oder GeneMapper ID-X).

Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist für den Gebrauch mit dem 3500/3500xL Genetic Analyzer validiert, für den die folgende Software benötigt wird:

- 3500 Data Collection Software v1 oder v2
- HID Updater 3500 Data Collection v2.0

Hinweis: Der Anwender muss am PC als lokaler Administrator oder mit ausreichenden Zugriffsrechten angemeldet sein, um Daten in die entsprechenden Dateien zu schreiben.

Detaillierte Anweisungen zur Systemeinrichtung, spektralen Kalibrierung und Anwendung der Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software v1 oder v2 und der GeneMapper *ID-X* Software v1.2 finden Sie im *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* (Handbuch zum Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer).

Der Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer hat 8 Kapillaren. Der Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer hat 24 Kapillaren.

Für die kombinierte Anwendung der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz „AnyDye“ verwendet. Dieser Matrixstandard wird als BT5 bezeichnet.

Die für die Elektrophorese benötigten Materialien sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24. Für die Elektrophorese benötigte Materialien

Material	Spezifikationen
Kapillare	36-cm-Array für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Polymer	POP-4 für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer
Puffer	Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series

Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung

Führen Sie vor der Durchführung der DNA-Fragmentlängenanalyse für jeden Analyzer eine spektrale Kalibrierung mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO durch (siehe Tabelle 25). Bei der Kalibrierung wird eine Matrix erzeugt, mit deren Hilfe die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe korrigiert wird.

Wichtig: Die spektrale Kalibrierung muss für jedes neue Kapillar-Array durchgeführt werden. Sie besteht aus den folgenden Schritten:

- Vorbereiten des Geräts
- Vorbereiten der Standardkalibrierplatte
- Zusammenstellen der Platte und Laden der Platte in das Gerät
- Einrichten der Software für Farbstoffsatz BT5
- Durchführen eines spektralen Kalibrierlaufs
- Überprüfen der Matrix

Vorbereiten des Geräts

Stellen Sie sicher, dass vor der spektralen Kalibrierung eine räumliche Kalibrierung durchgeführt wurde. Eine detaillierte Beschreibung dieses Vorgangs finden Sie im *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* (Benutzerhandbuch für Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer).

Tabelle 25. Die 5 Fluoreszenzmarker von BT5

Farbe	Matrixstandard
Blau (B)	6-FAM
Grün (G)	BTG
Gelb (Y)	BTY
Rot (R)	BTR
Orange (O)	BTO

Vorbereiten der Standardkalibrierplatte für 8 Kapillaren (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Bevor Sie die Röhrchen öffnen, vortexen und zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 26 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 26. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 8 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	90 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	10 µl

3. Vortexen Sie das Gemisch und zentrifugieren Sie es dann kurz.
4. Geben Sie jeweils 10 µl des Gemisches in 8 Wells einer 96-Well-Platte (Positionen A1–H1).
5. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
6. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**
Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Vorbereiten der Standardkalibrierplatte für 24 Kapillaren (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)

1. Bevor Sie die Röhrchen öffnen, vortexen und zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 27 ein Gemisch aus Formamid und Matrixstandard BT5 her.

Tabelle 27. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 24 Kapillaren

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	225 µl
Matrixstandard BT5, mehrere Kapillaren	25 µl

3. Vortexen Sie das Gemisch und zentrifugieren Sie es dann kurz.
4. Geben Sie jeweils 10 µl des Gemisches in 24 Wells einer 96-Well-Platte (Positionen A1–H1, A2–H2 und A3–H3).
5. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
6. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**
Zum Kühlen der Platte können Sie alternativ den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.

Zusammenstellen der Platte und Laden der Platte in das Gerät

Eine detaillierte Beschreibung der erforderlichen Schritte finden Sie im *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* (Benutzerhandbuch für Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer).

Einrichten der Software für Farbstoffsatz BT5

Vor der spektralen Kalibrierung muss ein Farbstoffsatz für den Matrixstandard BT5 eingerichtet werden.

1. Wählen Sie zum Erstellen eines neuen Farbstoffsatzes „Library“ (Bibliothek) aus. Wählen Sie unter „Analyze“ (Analysieren) „Dye Sets“ (Farbstoffsätze) aus und klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).
2. Geben Sie unter „Dye Set Name“ (Name Farbstoffsatz) einen Namen für den Farbstoffsatz ein, z. B. BT5.
3. Wählen Sie unter „Chemistry“ (Chemie) die Option „Matrix Standard“ (Matrixstandard) aus und wählen Sie für „Dye Set Template“ (Farbstoffsatzvorlage) „AnyDye Template“ (AnyDye-Vorlage) aus.
4. Deaktivieren Sie im Feld „Arrange Dyes“ (Farbstoffe anordnen) die Option „Purple“ (Lila). Stellen Sie sicher, dass alle anderen Farben aktiviert sind.
5. Die Farben müssen unter „Calibration Peak Order“ (Kalibrierpeak-Reihenfolge) wie folgt angeordnet werden: 5 – blau, 4 – grün, 3 – gelb, 2 – rot und 1 – orange.
6. Die Einstellungen unter „Parameter“ dürfen nicht verändert werden.
7. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern), um die Änderungen zu bestätigen.

Create New Dye Set

Setup a Dye Set

* Dye Set Name: BT5

* Chemistry: Matrix Standard

* Dye Set Template: AnyDye Template

Arrange Dyes

Dye Selection	Reduced Selection	Calibration Peak Order
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	0
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

Parameters

The parameters will be used for instruments configured with 36cm capillary array and polymer POP4

Matrix Condition Number Upper Limit: 20.0

Locate Start Point: * After Scan: 300 * Before Scan: 5000

* Limit Scans To: 20000

Sensitivity: 0.1

* Minimum Quality Score: 0.8

Notes

Matrix Std. BT5 multi cap.

Close Save

Abbildung 2. Einrichtung des Farbstoffsatzes BT5

Durchführen eines spektralen Kalibrierlaufs

Die spektrale Kalibrierung kann gestartet werden, nachdem die Multiwell-Platten mit dem Gemisch für die spektrale Kalibrierung auf das Autosampler-Tablett gestellt wurden.

1. Um den Bildschirm „Spectral Calibration“ (Spektrale Kalibrierung) aufzurufen, wählen Sie auf dem Dashboard der 3500 Series Data Collection Software „Maintenance“ (Wartung) aus.
2. Zum Einrichten einer Kalibrierung gehen Sie zu „Calibrate“ (Kalibrieren) und wählen „Spectral“ (Spektral) und dann „Calibration Run“ (Kalibrierlauf) aus.
3. Die Anzahl der Wells auf der Platte für die spektrale Kalibrierung und die Position im Gerät müssen angegeben werden.

4. Wählen Sie unter „Chemistry Standard“ (Chemiestandard) die Option „Matrix Standard“ (Matrixstandard) aus. Wählen Sie dann unter „Dye Set“ (Farbstoffsatz) den Farbstoffsatz aus, z. B. den zuvor erstellten Farbstoffsatz BT5 (siehe Schritt 2).
5. (Optional) Aktivieren Sie „Allow Borrowing“ (Übernahme zulassen).
6. Klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten).

Überprüfen der Matrix

Klicken Sie in der Tabelle auf eine Kapillare, um unter der Tabelle der Laufergebnisse die Ergebnisse (Kapillare, Qualitätswert und Konditionszahl) für jede Kapillare anzuzeigen.

- Der Qualitätswert (Q-Wert) jeder Kapillare muss über 0,8 liegen und die Konditionszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen.
- Untersuchen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Wie in der Abbildung 3 beschrieben, sollten in jeder Matrixprobe 5 Peaks mit Höhen im Bereich von 1000–5000 RFU vorhanden sein. (**Hinweis:** Der optimale Bereich beträgt 2000–4000 RFU.)

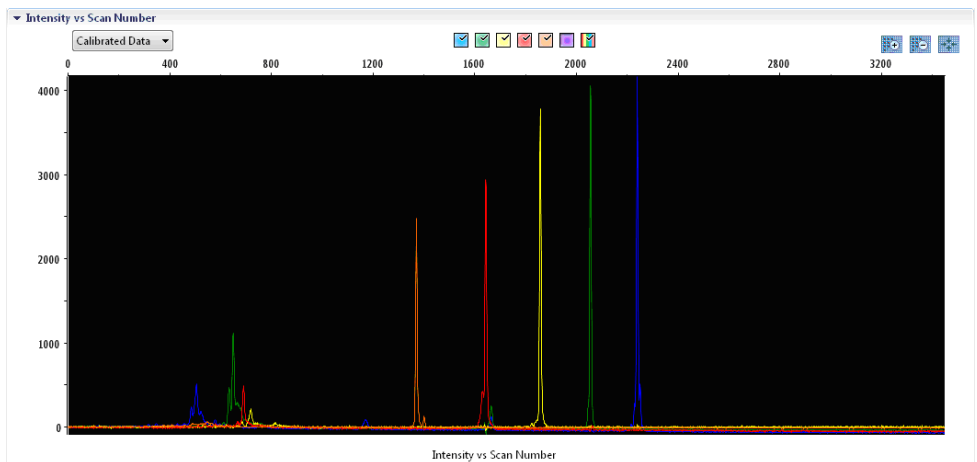


Abbildung 3. Elektropherogramm der spektralen Kalibrierung mit Matrixstandard BT5 auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer

Nach dem erfolgreichen Abschluss einer spektralen Kalibrierung werden in der Zeile „Overall“ (Gesamt) die Ergebnisse für Grün angezeigt. Wenn in der Zeile „Overall“ (Gesamt) Ergebnisse für Rot angezeigt werden, sehen Sie den Abschnitt „Spectral calibration troubleshooting“ (Fehlerbehebung zur spektralen Kalibrierung) im *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* (Benutzerhandbuch für Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer) ein.

▼ Capillary Run Data

Capillary	1	2	3	4	5	6	7	8
Run 1	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 2								
Run 3								
Overall	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed

■ Passed
 ■ Failed
 ■ Borrowed
 ☐ Not Calibrated

Abbildung 4. Beispiel einer erfolgreichen spektralen Kalibrierung mit Matrixstandard BT5 für alle Kapillaren auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer

Wählen Sie für jede Kapillare die Spektral- und Rohdaten aus und zeigen Sie diese an. Stellen Sie sicher, dass die Daten die folgenden Kriterien erfüllen:

- Die Reihenfolge der Peaks im Spektralprofil lautet von links nach rechts: Orange-Rot-Gelb-Grün-Blau.
- Das Rohdatenprofil darf keine fremden Peaks aufweisen.
- Die Peakmorphologie des Spektralprofils darf keine größeren Überlappungen, Einbrüche oder anderen Unregelmäßigkeiten aufweisen. Die Peaks müssen deutlich voneinander getrennt sein.

Wenn die Daten für alle Kapillaren die oben beschriebenen Kriterien erfüllen, klicken Sie auf „Accept“ (Akzeptieren). Wenn die Daten einer Kapillare die oben beschriebenen Kriterien nicht erfüllen, klicken Sie auf „Reject“ (Ablehnen). Sehen Sie in diesem Fall die Informationen im Abschnitt „Spectral calibration troubleshooting“ (Fehlerbehebung zur spektralen

Kalibrierung) im *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* (Benutzerhandbuch für Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer) ein.

Probenvorbereitung

1. Bevor Sie die Röhrchen öffnen, vortexen und zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhrchen absetzt.
2. Stellen Sie gemäß Tabelle 28 ein Gemisch aus Formamid und DNA-Größenstandard her.
3. Vortexen Sie das Gemisch und zentrifugieren Sie es dann kurz.
4. Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12 µl des Gemisches in ein Röhrchen.
5. Geben Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter zu (bei Bedarf verdünnt).
6. Denaturieren Sie 3 Minuten lang bei 95 °C.
7. **Schockgefrieren Sie, indem Sie die Platte 3 Minuten lang auf Eis legen.**
Zum Kühlen der Platte können Sie den Thermocycler auch auf 4 °C einstellen.
8. Stellen Sie die Proben auf das Tablett.

Tabelle 28. Herstellung eines Gemisches aus Formamid und DNA-Größenstandard

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamid	12,0 µl
DNA-Größenstandard 550 (BTO)	0,5 µl

Hinweis: Da die Injektionen in allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen mindestens 1 vollständige Spalte (8-Proben-Protokoll) bzw. 3 vollständige Spalten (24-Proben-Protokoll) auf die Platte eines Mehrkapillargeräts pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden sollen, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di-Formamid gefüllt werden.

Um auf Mehrkapillargeräten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, injizieren Sie für jeden Satz aus 24 Proben eine Allelleiter.

- 8-Kapillar-Geräte: Eine Allelleiter pro 3 Injektionen
- 24-Kapillar-Geräte: Eine Allelleiter pro Injektion

Wichtig: Die tatsächliche Raumtemperatur hat bei Mehrkapillargeräten einen Einfluss auf die Leistung der PCR-Produkte, so dass insbesondere bei niedrigen Temperaturen Schulterpeaks oder gesplittete Peaks auftreten können. **Stellen Sie sicher, dass die vom Gerätehersteller empfohlenen Umgebungsbedingungen eingehalten werden.** Stellen Sie darüber hinaus sicher, dass die Puffer vor dem Gebrauch auf die Umgebungstemperatur gebracht wurden.

Einrichten eines Laufs

Wenn Sie das Investigator ESSplex SE QS Kit zum ersten Mal auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer verwenden, müssen Sie zunächst eine Reihe von Protokollen einrichten.

- Geräteprotokoll
- Größenstandard
- QC-Protokoll
- Assay

Alle Protokolle können über das Dashboard der 3500 Series Data Collection Software eingerichtet werden.

Geräteprotokoll

1. Wählen Sie zur Einrichtung des Geräteprotokolls „Library“ (Bibliothek) aus. Wählen Sie dann unter „Instrument Protocols“ (Geräteprotokolle) die Option „Analyze“ (Analysieren) aus. Klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).

Hinweis: Ändern Sie die Laufmodul-Standard Einstellungen von „HID36_POP4“ auf die in Tabelle 29 aufgeführten Werte.

2. Für Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer müssen die in Tabelle 29 aufgeführten Parameter eingegeben oder ausgewählt werden. Für Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer müssen die in Tabelle 30 aufgeführten Parameter eingegeben oder ausgewählt werden.
3. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern), um die Änderungen zu bestätigen.

Tabelle 29. Parameter des Geräteprotokolls für Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer

Parameter	Einstellung
Application Type (Anwendungstyp)	HID
Capillary Length (Kapillarlänge)	36 cm
Polymer	POP4
Dye Set (Farbstoffsatz)	Z. B. BT5
Run Module (Laufmodul)	HID36_POP4
Protocol Name (Protokollname)	Z. B. Investigator ESSplex SE QS
Oven Temperature (Ofentemperatur, °C)	Standard (60)
Run Voltage (Laufspannung, kV)	13,0
Run Voltage (Vorlaufspannung, kV)	Standard (15)
Injection Voltage (Injektionsspannung, kV)	1,2
Run Time (Laufzeit, s)	1550
Run Time (Vorlaufzeit, s)	Standard (180)
Injection Time (Injektionszeit, s)	30,0*
Data Delay (Wartezeit Daten, s)	Standard (1)
Advanced Options (Erweiterte Optionen)	Standard

* Wenn Sie von den Standardeinstellungen abweichen, kann die Injektionszeit je nach Probentyp zwischen 1 und 35 s betragen. Wenn Proben mit einer sehr hohen Signalintensität aufgezeichnet werden, können kürzere Injektionszeiten verwendet werden. Für Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt kann eine Injektionszeit von bis zu 35 s erforderlich sein.

Tabelle 30. Parameter des Geräteprotokolls für Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer

Parameter	Einstellung
Application Type (Anwendungstyp)	HID
Capillary Length (Kapillarlänge)	36 cm
Polymer	POP4
Dye Set (Farbstoffsatz)	Z. B. BT5
Run Module (Laufmodul)	HID36_POP4
Protocol Name (Protokollname)	Z. B. Investigator ESSplex SE QS
Oven Temperature (Ofentemperatur, °C)	Standard (60)
Run Voltage (Laufspannung, kV)	13,0
Run Voltage (Vorlaufspannung, kV)	Standard (15)
Injection Voltage (Injektionsspannung, kV)	1,6
Run Time (Laufzeit, s)	1550
Run Time (Vorlaufzeit, s)	Standard (180)
Injection Time (Injektionszeit, s)	25,0*
Data Delay (Wartezeit Daten, s)	Standard (1)
Advanced Options (Erweiterte Optionen)	Standard

* Wenn Sie von den Standardeinstellungen abweichen, kann die Injektionszeit je nach Probentyp zwischen 1 und 30 s betragen. Wenn Proben mit einer sehr hohen Signalintensität aufgezeichnet werden, können kürzere Injektionszeiten verwendet werden. Für Proben mit einem sehr geringen DNA-Gehalt kann eine Injektionszeit von bis zu 30 s erforderlich sein.

Größenstandard

1. Wählen Sie zur Festlegung des Größenstandards „Library“ (Bibliothek) aus. Wählen Sie unter „Analyze“ (Analysieren) dann „Size Standards“ (Größenstandards) aus und klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).
2. Die in Tabelle 30 aufgeführten Parameter müssen eingegeben oder ausgewählt werden.
Der DNA-Größenstandard 550 (BTO) sollte mit den folgenden Fragmentlängen verwendet werden: 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 und 550 bp.

3. Sie können mit Hilfe der empfohlenen Investigator-Template-Datei „SST-BTO_60-500bp“ alternativ auch die Parameter des DNA-Größenstandards 550 (BTO) importieren (siehe Tabelle 31).
4. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern), um die Änderungen zu bestätigen.

Tabelle 31. Parameter des Größenstandards

Parameter	Einstellungen
Size Standard (Größenstandard)	Z. B. SST-BTO_60-500bp
Dye Color (Farbstofffarbe)	Orange

QC Protocol (QC-Protokoll)

1. Wählen Sie zur Einrichtung des QC-Protokolls „Library“ (Bibliothek) aus. Wählen Sie unter „Analyze“ (Analysieren) dann „QC Protocols“ (QC-Protokolle) aus und klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).
2. Die in Tabelle 32 aufgeführten Parameter müssen eingegeben oder ausgewählt werden.

Tabelle 32. Parameter des QC-Protokolls

Parameter	Einstellungen
Protocol Name (Protokollname)	Z. B. BTO_550
Size Standard (Größenstandard)	SST-BTO_60-500bp
Sizecaller	SizeCaller v1.1.0

3. Wählen Sie unter „Analysis Settings“ (Analyseeeinstellungen) „Peak Amplitude Threshold“ (Grenze Peakamplitude) aus und deaktivieren Sie „Purple“ (Lila). Stellen Sie sicher, dass alle anderen Farben aktiviert sind.

Berücksichtigen Sie die empfohlenen Analyseeeinstellungen in Tabelle 35 auf Seite 52. Für alle anderen Einstellungen ist die Standardeinstellung „Default“ beizubehalten.
4. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern), um die Änderungen zu bestätigen.

Assay

1. Wählen Sie zur Einrichtung eines Assays unter „Manage“ (Verwaltung) „Library“ (Bibliothek) aus. Wählen Sie dann „Assays“ aus und klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).
Zur Analyse der Fragmente des Investigator ESSplex SE QS Kits müssen die in Tabelle 33 aufgeführten Parameter ausgewählt werden.
2. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern), um die Änderungen zu bestätigen.

Tabelle 33. Assay-Parameter

Parameter	Einstellungen
Assay Name	Z. B. Investigator ESSplex SE QS
Farbe	Standard
Application Type (Anwendungstyp)	HID
Instrument Protocol (Geräteprotokoll)	Z. B. Investigator ESSplex SE QS
QC Protocols (QC-Protokolle)	Z. B. BTO_550

Starten des Laufs

1. Klicken Sie im Dashboard auf „Create New Plate“ (Neue Platte erstellen).
2. Wählen Sie unter „Setup“ (Einrichtung) „Define Plate Properties“ (Platteneigenschaften festlegen) und dann „Plate Details“ (Plattendetails) aus. Wählen Sie die in Tabelle 34 beschriebenen Parameter aus oder geben Sie diese ein.

Tabelle 34. Platteneigenschaften

Parameter	Einstellungen
Name	Z. B. Investigator ESSplex SE QS
Number of Wells (Anzahl Wells)	96
Plate Type (Plattentyp)	HID
Capillary Length (Kapillarlänge)	36 cm
Polymer	POP4

3. Klicken Sie auf „Assign Plate Contents“ (Platteninhalt zuweisen), um die Änderungen zu bestätigen.
4. Geben Sie für jedes Well mit einer Probe oder Allelleiter den festgelegten Probenamen ein. Dadurch werden für die Erfassung und Verarbeitung der Daten die Well-Positionen der Proben festgelegt.
5. Wählen Sie unter „Assay“ das gewünschte Assay für die Analyse aus. Wenn Sie die unter „Einrichten eines Laufs“ beschriebenen Schritte ausgeführt haben, klicken Sie auf „Add from Library“ (Von Bibliothek hinzufügen). Wählen Sie dann für „Instrument Protocol“ (Geräteprotokoll) die Option „Investigator ESSplex SE QS“ aus. Allen benannten Wells auf der Platte muss ein Assay zugewiesen werden.
6. Wiederholen Sie diesen Vorgang für „File name conventions“ (Dateinamenkonventionen) und „Results group“ (Ergebnisgruppe).
7. Wählen Sie die Wells aus, für die ein Assay festgelegt werden soll. Aktivieren Sie die Kontrollkästchen neben den Namen von „Assay“, „File name conventions“ (Dateinamenkonventionen) und „Results group“ (Ergebnisgruppe), um diese den ausgewählten Wells zuzuweisen.
8. Laden Sie die zusammengestellte Platte in das Gerät und schließen Sie die Geräteklappe, um das Gerät zu initialisieren. Klicken Sie dann auf „Link Plate for Run“ (Platte für Lauf verknüpfen). Geben Sie auf dem nächsten Bildschirm den gewünschten Laufnamen ein und klicken Sie dann auf „Start Run“ (Lauf starten).

Analyseparameter/Analysemethode

In Tabelle 35 sind die empfohlenen Analyseparameter des Arbeitsblatts „Peak Detector“ (Peakerkennung) zusammengefasst.

Tabelle 35. Empfohlene Einstellungen für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Parameter	Einstellungen
Peak Detection Algorithm (Peakerkennungs-Algorithmus)	Advanced (Erweitert)
Ranges (Bereiche)	Analyse: Partial Range (Teilbereich) Start Point (Anfangspunkt): 1000; Stop Point (Endpunkt): 20.000 Sizing (Größe): All Sizes (Alle Größen)
Smoothing and Baselineing (Glättung und Basislinie)	Smoothing (Glättung): Light (Leicht) Baseline Window (Basislinienfenster): 51 pts
Size Call Method (Methode Größenbestimmung)	Local Southern Method
Peak Detection (Peakerkennung)	Peak Amplitude Thresholds (Grenzen Peakamplitude) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. Peak-Halbwertsbreite): 2 pts Polynomial Degree (Grad des Polynoms): 3 Peak Window Size (Größe Peakfenster): 11 pts† Slope Thresholds (Grenzen Steigung): 0.0

* Die Grenze der Peakamplitude (Cut-off-Wert) entspricht der MindestPeakhöhe, die von der GeneMapper ID-X Software erkannt wird. Die Grenzwerte liegen normalerweise im Bereich von 50–200 RFU und sind vom jeweiligen Labor selbst zu bestimmen.

Empfehlung: Die MindestPeakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Untergrundrauschens der Basislinie entsprechen.

† Ausschließlich die Einstellung für „Peak Window Size“ (Größe Peakfenster) unterscheidet sich von den Applied Biosystems-Standardwerten für die Humanidentifizierung.

Protokoll: Analyse

Allgemeine Informationen zur automatischen Probenanalyse finden Sie in den entsprechenden Handbüchern für die GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X* Software.

Die Fähigkeiten zur Lokalisierung der genauen Längen der amplifizierten Produkte hängen vom Gerätetyp, den Elektrophoresebedingungen und dem verwendeten DNA-Größenstandard ab. Aufgrund der Komplexität einiger Loci sollten für die Größenbestimmung gleichmäßig verteilte Referenzen herangezogen werden. Der DNA-Größenstandard 550 (BTO, siehe Abbildung 5) sollte mit den folgenden Fragmentlängen verwendet werden: 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 und 550 bp.

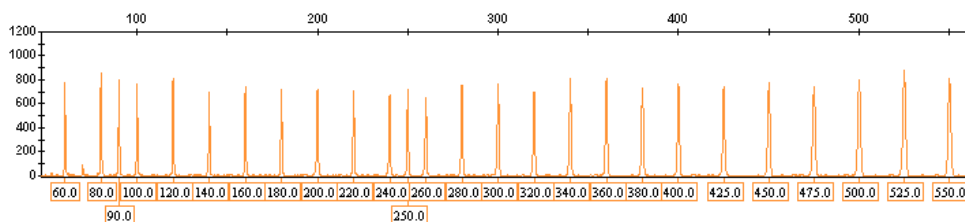


Abbildung 5. Elektropherogramm des DNA-Größenstandards 550 (BTO), Fragmente mit Längen in bp

Analysesoftware

Die Allelzuordnung ist mit einer geeigneten Analysesoftware, z. B. GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X* Software, und in Verbindung mit den Investigator-Template-Dateien durchzuführen, die von **www.qiagen.com** heruntergeladen werden können (siehe Tabelle 36 und Tabelle 37).

Tabelle 36. Empfohlene Investigator-Template-Dateien für GeneMapper ID

Dateityp	Dateiname
Panels	ESSplex_SE_QS_Panels
BinSets	ESSplex_SE_QS_Bins
Größenstandard	SST-BTO_60–500bp
Analysemethode	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu
Diagrammeinstellungen	Plots_5dyes

Panels und BinSets müssen immer verwendet werden; die Verwendung anderer Template-Dateien ist optional.

Tabelle 37. Empfohlene Investigator-Template-Dateien für GeneMapper ID-X

Dateityp	Dateiname
Panels	ESSplex_SE_QS_Panels_x
BinSets	ESSplex_SE_QS_Bins_x
Stutter	ESSplex_SE_QS_Stutter_x
Größenstandard	SST-BTO_60–500bp
Analysemethode	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Diagrammeinstellungen	Plots_5dyes

Panels und BinSets müssen immer verwendet werden; die Verwendung anderer Template-Dateien ist optional.

Kontrollen

Die in Tabelle 38 aufgeführten Allele stellen die Kontroll-DNA 9948 (im Investigator ESSplex SE QS Kit enthalten) und die DNA von anderen handelsüblichen Standardzelllinien dar.

Tabelle 38. Allelzuordnung mit dem Investigator ESSplex SE QS Kit

Locus	CCR 9948	CCR 9947A
Amelogenin	X/Y	X/X
D1S1656	14/17	18,3/18,3
D2S441	11/12	10/14
D2S1338	23/23	19/23
D3S1358	15/17	14/15
D8S1179	12/13	13/13
D10S1248	12/15	13/15
D12S391	18/24	18/20
D16S539	11/11	11/12
D18S51	15/18	15/19
D19S433	13/14	14/15
D21S11	29/30	30/30
D22S1045	16/18	11/14
FGA	24/26	23/24
SE33	23,2/26,2	19/29,2
THO1	6/9,3	8/9,3
vWA	17/17	17/18

Die oben dargestellte Tabelle enthält die Allele der Referenz-DNA, die von Coriell Cell Repositories (CCR) erworben wurde, sowie 3 weitere Referenz-DNAs von CCR und ATCC bis zum Standard von Szibor et al. (2003).

Qualitätssensor

Das Investigator ESSplex SE QS Kit enthält zwei interne PCR-Kontrollen (Qualitätssensor QS1 und QS2), die hilfreiche Informationen über die Effizienz der PCR-Amplifikation im Allgemeinen und die Gegenwart von PCR-Inhibitoren liefern. Die internen Qualitätssensoren sind im Primer-Gemisch enthalten und werden zeitgleich mit den polymorphen STR-Markern amplifiziert. Die Qualitätssensoren sind mit FAM markiert und treten in den Fragmentgrößen 71 bp (QS1) und 435 bp (QS2) auf.

Um mögliche Probleme mit ähnlichen Sequenzen und nicht spezifischen Bindungen auszuschließen, wurde auf der Grundlage eines Zufallsalgorithmus ein synthetisches internes Kontroll-DNA-Template entwickelt. Die Template-Sequenz unterscheidet sich von allen bekannten DNA-Sequenzen und weist insbesondere keine Ähnlichkeit mit Human-DNA auf. Die Wahrscheinlichkeit einer nicht spezifischen Bindung im Rahmen einer Multiplex-PCR-Amplifikationsreaktion ist daher sehr gering.

Eine erfolgreiche Amplifikation des kleinen Qualitätssensors (QS 1) zeigt im Allgemeinen an, dass die PCR korrekt eingerichtet und durchgeführt wurde. Dabei ist es unerheblich, ob in der Probe DNA vorlag oder nicht. Wenn bei der Analyse der Amplifikationsprodukte kein Qualitätssensor nachgewiesen wird, bedeutet das, dass beim Pipettieren in der PCR-Einrichtung oder bei der PCR-Durchführung selbst Fehler begangen wurden. Die Analyse sollte in diesem Fall wiederholt werden und der Anwender sollte bei der Einrichtung mit größerer Sorgfalt vorgehen, um bessere Ergebnisse zu erhalten.

Sensitivitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass die internen Kontrollen keinen Effekt auf die Durchführung der PCR haben. Bei der Amplifikation von geringen DNA-Template-Mengen wurden für Primer-Gemische mit oder ohne Qualitätssensoren ähnliche Ergebnisse erhalten.

Die Analyse der beiden internen Kontrollfragmente QS1 und QS2 sowie der Amplifikationsprodukte der STR-Zielsequenz ermöglichen es, auf differenzielle Weise festzustellen, ob in

einer Amplifikationsreaktion Inhibitoren vorliegen oder DNA-Zersetzungsprozesse stattgefunden haben.

Bei einer Probenzersetzung ist die Amplifikation kleinerer Zielfragmente effizienter als die größerer. Eine Zersetzung des Ziel-Templates behindert jedoch nicht die Amplifikation der internen Kontrollfragmente vom internen Kontroll-Template (siehe Abbildung 6). Ein ausgeglichenes Verhältnis von QS1 zu QS2 in Verbindung mit einem Verhältnis zugunsten kleiner STR-Zielfragmente weist daher auf eine Zersetzung der Probe hin.

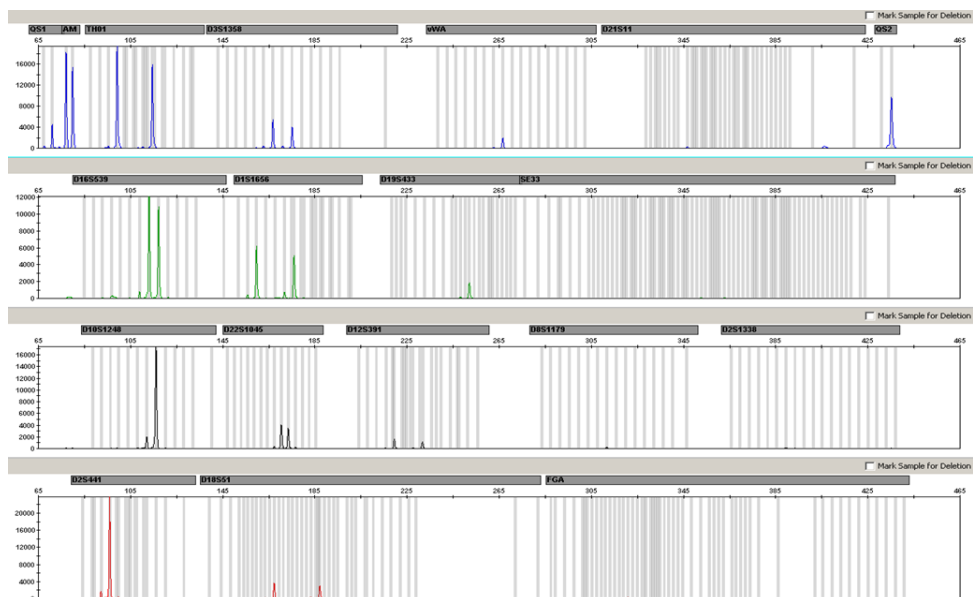


Abbildung 6. Elektropherogramm der STR-Analyse in der Gegenwart von zersetzter DNA (Fragmente von 150 bp). Die genomische DNA wurde mittels Ultraschall in 150bp-Fragmente geschert. Die großen STR-Fragmente wurden mit einem sehr geringen PCR-Ertrag amplifiziert, QS1 und QS2 wurden jedoch mit normalen Peakhöhen amplifiziert. Die Marker sind oben im Elektropherogramm angegeben. Die Qualitätssensoren sind mit FAM markiert (Panel 1) und treten in den Fragmentgrößen 71 bp (QS1) und 435 bp (QS2) auf.

Wenn Inhibitoren wie Hämatin oder Huminsäure in der Probe vorhanden sind, ist die Amplifikation weniger effizient und die größeren DNA-Fragmente werden weniger amplifiziert als die kleineren. Wenn die Analyse der Amplifikationsprodukte auf eine ineffiziente

Amplifikation der größeren STR-Zielsequenzen und des größeren QS2-Fragments hinweist, der kleinere Qualitätssensor (QS1) jedoch erfolgreich amplifiziert wurde, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Probe mit Inhibitoren kontaminiert ist. Eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des kleineren Qualitätssensors (QS1) weist somit auf die Gegenwart von Inhibitoren hin (siehe Abbildung 7).

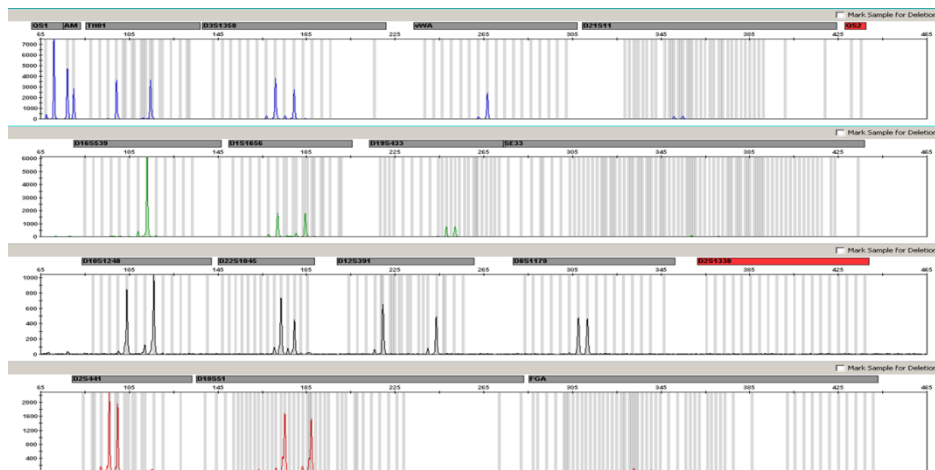


Abbildung 7. Elektropherogramm der STR-Analyse in der Gegenwart von Hämatin. Es wurden 16 STR-Marker, Amelogenin und die beiden Qualitätssensoren in der Gegenwart von 1000 µM Hämatin amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die Amplifikation der hochmolekularen Fragmente, einschließlich der STR-Marker mit über 250 bp und QS2, wurde durch den hohen Hämatingehalt inhibiert. Die Marker sind oben im Elektropherogramm angegeben. Die Qualitätssensoren sind mit FAM markiert (Panel 1) und treten in den Fragmentgrößen 71 bp (QS1) und 435 bp (QS2, nicht sichtbar) auf.

Die Analyse auf die Gegenwart der beiden Qualitätssensoren ermöglicht es, auf differenzierte Weise festzustellen, ob PCR-Inhibitoren vorliegen oder ob in der forensischen Probe Zersetzungsprozesse stattgefunden haben. Dadurch erhält der Anwender hilfreiche Informationen zur Dateninterpretation und Planung der nächsten Schritte. Die Profileigenschaften und ihre Bedeutung sind in Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 39. Profileigenschaften und Bedeutung

Allel-Peaks	QS1	QS2	Interpretation
Vorhanden	Vorhanden	Vorhanden	Erfolgreiches Profil
Abwesend	Vorhanden	Vorhanden	Keine DNA
Abwesend	Abwesend	Abwesend	PCR nicht erfolgreich
Skipisten-Profil	Vorhanden	Abfallend	Inhibitoren vorhanden
Skipisten-Profil	Vorhanden	Vorhanden	Zersetzte DNA

Hinweis: Die Peakhöhen von QS1 und QS2 können sich von Analyse zu Analyse geringfügig unterscheiden. Eine geringe Streuung der Peakhöhe ist normal und nicht auf den Einfluss von Inhibitoren zurückzuführen. Die Variationsbreite ist bei der Validierung im Kontext des jeweiligen Probenotyps zu evaluieren und für beide Qualitätssensoren ist ein Normalbereich für die Peakhöhe festzulegen.

Ein Abfall des QS2-Signals auf unter 20 % des QS1-Signals zeigt eine Hemmung der PCR-Reaktion an.

Allele

Die Allele der Allelleiter sind in Tabelle 40 zusammengefasst. Alle Analysen wurden mit dem Polymer POP-4 durchgeführt (siehe Tabelle 40 und Abbildung 8). Die Verwendung unterschiedlicher Analysegeräte, DNA-Größenstandards oder Polymere kann zu unterschiedlichen Fragmentlängen führen. Es wird zudem eine visuelle Zuordnung mit der Allelleiter empfohlen.

Skalierung

- Horizontal: 65–465 bp
- Vertikal: je nach Signalintensität

Tabelle 40. Alleleiter-Fragmente des Investigator ESSplex SE QS Kits

Locus	Farbstoff	Repeat-Nummern der Alleleiter
QS1	6-FAM	S, Q
Amelogenin	6-FAM	X, Y
TH01	6-FAM	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,3, 10, 10,3, 11, 13, 13,3
D3S1358	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
vWA	6-FAM	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	6-FAM	24, 24,2, 25, 26, 26,2, 27, 28, 28,2, 29, 29,2, 30, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 35,2, 36, 36,2, 37, 38
QS2	6-FAM	Q, S
D16S539	BTG	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D1S1656	BTG	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14,3, 15, 15,3, 16, 16,3, 17, 17,3, 18, 18,3, 19,3, 20,3
D19S433	BTG	6,2, 8, 9, 10, 11, 12, 12,2, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 16,2, 17, 17,2, 18,2
SE33	BTG	3, 4,2, 6,3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23,2, 24,2, 25, 25,2, 26,2, 27,2, 28,2, 29,2, 30,2, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 36, 36,2, 37, 38, 39, 42
D10S1248	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D12S391	BTY	14, 15, 16, 17, 17,3, 18, 18,3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR	8, 9, 10, 11, 11,3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D18S51	BTR	8, 9, 10, 10,2, 11, 12, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 16, 17, 17,2, 18, 18,2, 19, 20, 21, 21,2, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
FGA	BTR	14, 16, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22, 22,2, 23, 23,2, 24, 24,2, 25, 25,2, 26, 27, 28, 29, 30, 31,2, 33, 34, 37,2, 42,2, 43,2, 44,2, 45,2, 46,2, 47,2, 48,2, 50,2, 51,2

* Die Allele sind zur besseren Orientierung in der Alleleiter erhöht.

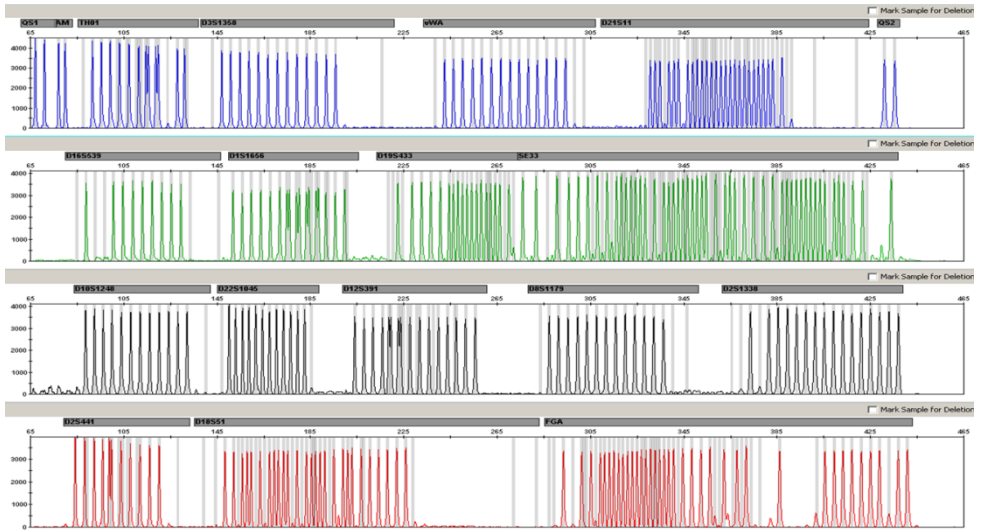


Abbildung 8. Elektropherogramm der Alleleiter ESSplex SE QS, die auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer analysiert wurde. Die Alleleiter enthält zwei Allele für jeden Qualitätssensor (QS1 und QS2). Dies ermöglicht eine automatische Bestimmung der QSPeaks im Rahmen der Probenanalyse.

Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus steht Ihnen unser QIAGEN Technischer Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter **www.qiagen.com**). Das Team besteht aus erfahrenen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, die Ihnen in allen molekularbiologischen Fragen gerne weiterhelfen.

Kommentare und Vorschläge

Unausgeglichene Profile, Signale geringer Intensität

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Falsches Volumen des Schnellreaktionsgemisches oder Primer-Gemisches | Reaktionseinrichtung überprüfen und Amplifikation wiederholen. |
| b) | Master-Mix vor der Verteilung nicht gevortext | Master-Mix gründlich vortexen und kurz zentrifugieren. |

Abfall der Peakhöhen von QS1 und/oder QS2 in den Standardanalysen

Eine geringe Streuung der Peakhöhe in den Qualitätssensoren ist normal und nicht auf den Einfluss von Inhibitoren zurückzuführen.

Die Variationsbreite ist bei der Validierung im Kontext des jeweiligen Probenotyps zu evaluieren und für beide Qualitätssensoren ist ein Normalbereich für die Peakhöhe festzulegen. Ein Abfall des QS2-Signals auf unter 20 % des QS1-Signals zeigt eine Hemmung der PCR-Reaktion an.

Probenvorbereitung

Die Signalintensität der Probe muss erhöht werden.

Das Volumen des DNA-Größenstandards 550 (BTO) auf eine Peakhöhe von etwa 500 RFU reduzieren.

Die PCR-Produkte vor Beginn der Analyse aufreinigen. Für eine schnelle und effektive Aufreinigung empfehlen wir das MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 28004 und 28006).

Unzureichende Matrix bzw. spektrale Kalibrierung

Mit der aktuellen Matrix bzw. spektralen Kalibrierung befinden sich Pull-up-Peaks zwischen den Farbpanels (B, G, Y, R und O).

Diese Matrix darf für die Analyse nicht verwendet werden. Die Matrixherstellung bzw. spektrale Kalibrierung wiederholen. Darauf achten, dass das richtige Protokoll für das jeweilige Analysegerät verwendet wird.

Viele Peaks sind in der Probe als Allele außerhalb des Leiterbereichs (OL, off-ladder) gekennzeichnet

- | | |
|--|---|
| a) Der DNA-Größenstandard 550 (BTO) wurde nicht richtig definiert oder identifiziert. | In der oberen Symbolleiste der GeneMapper ID oder GeneMapper ID-X Software auf das orangefarbene Symbol „Size Match Editor“ (Editor für die Größenzuordnung) klicken. Die orangefarbenen Fragmente aller Proben markieren. Für Investigator-PCR-Kits zur Humanidentifizierung immer den DNA-Größenstandard 550 verwenden. |
| b) Die Signalintensitäten sind zu hoch. Wenn die Peakhöhen der Proben außerhalb des linearen Nachweisbereichs (> 5000 RFU/ > 20000 RFU)* liegen, kann die Anzahl von Stutterpeaks, gesplitteten Peaks und Artefakten zunehmen. | Die Injektionszeit schrittweise auf ein Minimum von 1 Sekunde reduzieren, die Menge des PCR-Amplifikationsprodukts für die Analyse reduzieren oder die DNA-Menge für die PCR reduzieren. |
| c) Blasen in der Kapillare verursachen Pull-up-Peaks in allen Farbpanels („Spikes“), die zu einer Fehlzuzuordnung der Allele führen. | Die Elektrophorese zur Bestätigung der Ergebnisse wiederholen. Sicherstellen, dass die maximale vom Gerätehersteller empfohlene Anzahl von Injektionen nicht überschritten wurde. Bei Bedarf ein neues Kapillar-Array einrichten. |
| d) Unterschiede in der Laufleistung der Kapillaren eines Mehrkapillargeräts können zu Verschiebungen bei der Allelzuordnung führen. | Um auf Mehrkapillargeräten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, sollten mehrere Allelleitern analysiert werden. |
| e) Eine niedrige Raumtemperatur oder eine niedrige Temperatur des CE-Puffers kann zu einer Verschiebung der Fragmentmigration oder zu Peaks außerhalb des Leiterbereichs (OL, off-ladder) führen. | Sicherstellen, dass die vom Gerätehersteller empfohlenen Umgebungsbedingungen eingehalten werden. Sicherstellen, dass die Puffer vor dem Gebrauch auf die Umgebungstemperatur gebracht wurden. Der Gerätehersteller empfiehlt, das CE-Gerät (ungefähr 30 Minuten lang) vorzuwärmen. |

* > 5000 RFU für den 3100 und 3130 Genetic Analyzer; > 20000 RFU für den Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Inkorrekte Injektion bzw. Datei der Allelleiter

- | | |
|--|---|
| a) Fehlfunktionen während der Elektrophorese können dazu führen, dass ein zusätzliches Signal als Peak der Allelleiter identifiziert wird. Wenn Peaks der Allelleiter nicht korrekt bestimmt werden, darf die Leiter für die Analyse nicht verwendet werden. | Eine andere Injektion bzw. Datei der Allelleiter verwenden und die Daten der analysierten Größen des Größenstandards (in bp) der Allelleiter überprüfen.
Für Investigator-PCR-Kits zur Humanidentifizierung immer den DNA-Größenstandard 550 verwenden. |
| b) Ein Peak der Allelleiter liegt unterhalb des Peak-Nachweisbereichs (50–200 RFU) der verwendeten Analyseverfahren und wurde somit nicht identifiziert. | Die Allelleiter muss in einer Konzentration in das Analysegerät geladen werden, die über der Konzentration der zu analysierenden Proben liegt.
Die Daten der Allelleiter können auch mit einer niedrigeren Peak-Nachweisgrenze in der Analysesoftware analysiert werden. |
| c) Ein Peak der Allelleiter wurde nicht identifiziert, weil er außerhalb des erwarteten Größenbereichs der Software (in bp) lag. | Die Länge der Fragmente (in bp) des ersten Allels in einer Farbe der Allelleiter mit dem entsprechenden Wert in den Kategorien vergleichen. Diesen dann mit den anderen Allelen vergleichen. |
| d) Es werden keine Punktallele gefunden. | Punktallele sind Allele mit einem Unterschied von mindestens 1 bp zum nächsten ganzzahligen Allel. Die Einstellungen der Analyseverfahren überprüfen. Den Wert für „Peak Window Size“ (Größe Peakfenster) auf 11 Punkte reduzieren. |
| e) Unterschiede in der Laufleistung der Kapillaren eines Mehrkapillargeräts können zu Verschiebungen bei der Allelzuordnung führen. | Um auf Mehrkapillargeräten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, sollten mehrere Allelleiter analysiert werden. |

Literatur

QIAGEN unterhält eine umfangreiche und regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, die auf Grundlage von QIAGEN Produkte erstellt wurden. Mit Hilfe der zahlreichen Suchoptionen können Sie nach den gewünschten Beiträgen suchen – entweder mit der einfachen Stichwortsuche oder durch Angabe der Applikation, des Forschungsbereichs, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Literaturverweise erhalten Sie vom QIAGEN Technischen Service.

Literaturverweise

1. De Roock, W. et al. (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.
2. Hill, C.R., Kline, M.C., Coble, M.D., and Butler, J.M. (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.*, **53**, 73.
3. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

Anhang: Interpretation der Ergebnisse

Durch die Verwendung einer geeigneten Analysesoftware für die Post-PCR-Analyse und automatische Allelzuordnung wird eine präzise und zuverlässige Unterscheidung der Allele gewährleistet.

Allgemeine Vorgehensweise bei der Analyse

1. Prüfen des DNA-Größenstandards
2. Prüfen der Allelleiter
3. Prüfen der Positivkontrolle
4. Prüfen der Negativkontrolle
5. Analyse und Interpretation der Probandaten

Pull-up-Peaks

Pull-up-Peaks können auftreten, wenn die Peakhöhen außerhalb des linearen Nachweisbereichs liegen (siehe „Fehlerbehebung“ auf Seite 62) oder wenn eine inkorrekte Matrix angewendet wurde. Sie treten an den Positionen spezifischer Peaks von anderen Farbkälen auf und haben normalerweise eine niedrigere Signalintensität. Die Peakhöhen sollten die Grenzwerte nicht überschreiten, um das Auftreten von Pull-up-Peaks zu verhindern.

Stutterpeaks

Das Auftreten von Stutterpeaks wird von der Sequenz der Repeat-Struktur und der Anzahl der Allele bestimmt. $n-4$ Peaks werden durch den Verlust einer Wiederholungseinheit während der Amplifikation des STR-Tetranukleotid-Motivs verursacht. Dieser Verlust ist wiederum auf Rutsch-Effekte der Taq-DNA-Polymerase zurückzuführen. $n-3$ Peaks treten dagegen insbesondere bei der Amplifikation des Trinukleotid-STR-Motivs D22S1045 auf. Diese Peaks sind unter Verwendung der Investigator-Template-Dateien für die GeneMapper ID und GeneMapper ID-X Software zu interpretieren.

Template-unabhängige Zugabe von Nukleotiden

Die *Taq*-DNA-Polymerase kann aufgrund ihrer terminalen Transferaseaktivität zu einer unvollständigen Adenylierung am 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments führen. Der Artefakt-Peak ist eine Base kürzer als der erwartete Peak (–1 Peaks). Alle im Investigator ESSplex SE QS Kit enthaltenen Primer sind so ausgelegt, dass diese Artefakte auf ein Minimum reduziert werden. Die Peakhöhe des Artefakts steht mit der DNA-Menge in Verbindung. Jedes Labor sollte eigene Grenzwerte für die Analyse von Peaks festlegen.

Artefakte

Die Raumtemperatur hat bei Mehrkapillargeräten einen Einfluss auf die Leistung der PCR-Produkte, so dass Schulterpeaks oder gesplittete Peaks auftreten. Wir empfehlen, die Probe beim Auftreten von Schulterpeaks oder gesplittete Peaks erneut zu injizieren.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator ESSplex SE QS Kit (100)	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch 2.0, einschließlich Taq-DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, ESSplex SE QS Allelleiter, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381575
Investigator ESSplex SE QS Kit (400)	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch 2.0, einschließlich Taq-DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, ESSplex SE QS Allelleiter, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381577
Verwandte Produkte		
Matrix Standard BT5 multi cap. (25)	Matrixstandard 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO	386123
Matrix Standard BT5 multi cap. (50)	Matrixstandard 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO	386125
Investigator-PCR-Kits zur Humanidentifizierung		
Investigator 24plex QS Kit (100)*	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter 24plex, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	382415
Investigator 24plex GO! Kit (200)*	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter 24plex, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	382426

* Größere Kits sind auf Anfrage erhältlich.

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator ESSplex Plus Kit (100)*	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch, einschließlich HotStarTaq® <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter ESSplex Plus, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381535
Investigator ESSplex SE Plus Kit (100)*	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch, einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter ESSplex SE Plus, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381545
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Primer-Gemisch, Schnellreaktionsgemisch, einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter IDplex Plus, DNA-Größenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381625
Investigator HDplex Kit (100)	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	381215
Investigator Triplex AFS QS Kit (400)	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	380317
Investigator Triplex DSF Kit (400)	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	380327
Investigator Argus X-12 Kit (25)*	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	383213

* Größere Kits sind auf Anfrage erhältlich.

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator Argus Y-12 QS Kit (100)	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	383615
Investigator DIPplex Kit (100)*	Primer-Gemisch, Reaktionsgemisch, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Größenstandard und nukleasefreies Wasser	384015
Investigator Quantiplex HYres Kit (200)	Reaktionsgemisch FQ, Primer-Gemisch IC YQ, Kontroll-DNA Z1, QuantiTect®-Verdünnungspuffer für Nukleinsäuren	387116
Investigator Quantiplex Kit (200)	Reaktionsgemisch FQ, Primer-Gemisch IC FQ, Kontroll-DNA Z1, QuantiTect-Verdünnungspuffer für Nukleinsäuren	387016
DNA-Extraktion und -Aufreinigung		
QIAamp® DNA Investigator Kit (50)	50 QIAamp MinElute-Säulen, Proteinase K, Träger-RNA, Puffer, Probensammelröhrchen (2 ml)	56504
MinElute Reaction Cleanup Kit (50)*	50 MinElute Spin-Säulen, Puffer, Entnahmeröhrchen (2 ml)	28004
Rotor-Gene® Q		
Rotor-Gene Q 2plex	Echtzeit-PCR-Cycler mit 2 Kanälen, Notebook, Software, Zubehör; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	Auf Anfrage
Rotor-Gene Q 2plex HRM®	Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 2 Kanälen plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	Auf Anfrage

* Größere Kits sind auf Anfrage erhältlich.

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Rotor-Gene Q 5plex	Echtzeit-PCR-Cycler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot), Notebook, Software, Zubehör; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	Auf Anfrage
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Echtzeit-PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzkurven-Analyzer mit 5 Kanälen plus HRM-Kanal, Notebook, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	Auf Anfrage
Rotor-Gene Q 6plex	Echtzeit-PCR-Cycler mit 6 Kanälen, Notebook, Software, Zubehör; 1 Jahr Garantie auf Ersatzteile und Arbeitsleistung	Auf Anfrage

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. Diese stehen unter **www.qiagen.com** zur Verfügung oder können vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor angefordert werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, HotStarTaq®, HRM®, Investigator®, Making improvements in life possible®, MinElute®, QuantiTect®, Rotor-Gene® (QIAGEN-Gruppe); 3500™, ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avant6™, 6-FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Hi-Di™, POP4™ (Life Technologies Corporation); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (US Department of Health and Human Services). Bei registrierten Namen, Marken usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Namen bzw. registrierte Marke gekennzeichnet sind.

Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für das Investigator ESSplex SE QS Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückerfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

1095534DE HB-1963.001 06/2015 © 2015

Hinweise

Hinweise

Hinweise

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com