

Oktober 2012

---

# Investigator<sup>®</sup> ESSplex SE Plus Handbuch

Für eine Multiplex-Amplifikation des neuen  
Europäischen Standardsatzes plus SE33,  
und Amelogenin



---

Sample & Assay Technologies

## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN ist der führende Anbieter innovativer Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und zum Nachweis von Bestandteilen aus jeder biologischen Probe. Unsere technologisch und qualitativ hochwertigen Produkte und unser exzellenter Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

### **QIAGEN setzt Standards in:**

- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsysteme für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA-Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

Wir stellen Ihnen die neuesten Technologien zur Verfügung, damit Sie schnell und sicher die besten Ergebnisse erzielen können. Weitere Informationen finden Sie auf der Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Inhalt

<b>Kitinhalt</b>	<b>4</b>
<b>Lagerung</b>	<b>4</b>
<b>Vorgesehener Verwendungszweck</b>	<b>4</b>
<b>Sicherheitsinformationen</b>	<b>5</b>
<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>8</b>
<b>Protokolle</b>	
■ <b>PCR-Amplifikation</b>	<b>9</b>
■ <b>Elektrophorese mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer</b>	<b>12</b>
■ <b>Elektrophorese mit dem ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer</b>	<b>19</b>
■ <b>Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer</b>	<b>28</b>
■ <b>Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer</b>	<b>38</b>
■ <b>Analyse</b>	<b>51</b>
<b>Interpretation der Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>Hilfe zur Fehlersuche</b>	<b>60</b>
<b>Literatur</b>	<b>63</b>
<b>Bestellinformationen</b>	<b>64</b>

## Kitinhalt

<b>Investigator ESSplex SE Plus Kit</b>	<b>(100)</b>	<b>(400)</b>
<b>Katalog-Nr.</b>	<b>381545</b>	<b>381547</b>
<b>Anzahl 25-<math>\mu</math>l-Reaktionen</b>	<b>100</b>	<b>400</b>
Fast Reaction Mix (Schnelle Reaktionsmischung)*	750 $\mu$ l	2 x 1500 $\mu$ l
Primer Mix ESSplex SE Plus (Primermischung ESSplex SE Plus)	250 $\mu$ l	4 x 250 $\mu$ l
Control DNA 9948 (Kontroll-DNA 9948)	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
DNA size standard 550 (BTO) (DNA-Längenstandard 550 (BTO))	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Allelic ladder ESSplex SE Plus (Allelleiter ESSplex SE Plus)	25 $\mu$ l	4 x 25 $\mu$ l
Nuclease-free water (Nukleasefreies Wasser)	2 x 1,9 ml	5 x 1,9 ml
Quick-Start Protocol (Kurzprotokoll)	1	1

\* Enthält HotStarTaq<sup>®</sup> Plus DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin).

## Lagerung

Das Investigator ESSplex SE Plus Kit wird auf Trockeneis versandt. Es sollte sofort nach Erhalt bei –20 °C in einem Konstanttemperatur-Gefrierschrank gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

Primermischung und Allelleiter müssen vor Licht geschützt gelagert werden. DNA-Proben und Post-PCR-Reagenzien (Allelleiter und DNA-Längenstandard) müssen getrennt von den PCR-Reagenzien gelagert werden. Unter diesen Bedingungen sind die Komponenten bis zum auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum stabil.

Einmal geöffnet kann das Investigator ESSplex SE Plus Kit bei 4 bis 8 °C für höchstens 2 Wochen gelagert werden.

## Vorgesehener Verwendungszweck

Das Investigator ESSplex SE Plus Kit ist für molekularbiologische Anwendungen in der Forensik, der Humanidentifikation und bei Vaterschaftstests vorgesehen. Dieses Produkt ist nicht für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Krankheit bestimmt.

Die Produkte sollten mit der angemessenen Sorgfalt und Aufmerksamkeit verwendet werden. Wir empfehlen allen Benutzern von QIAGEN Produkten die Einhaltung der NIH-Richtlinien für Experimente mit rekombinanter DNA oder entsprechender anderer Richtlinien.

## **Sicherheitsinformationen**

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (safety data sheets, SDSs). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kitkomponente die vorgeschriebenen SDS bequem als kompakte PDF-Datei, die sie einsehen und ausdrucken können.

### **24-Stunden-Giftnotruf**

Im Notfall können Sie 24 Stunden am Tag medizinische Informationen (in deutscher, englischer und französischer Sprache) erhalten über den

Giftnotruf des Giftinformationszentrums Mainz (Deutschland)

Tel.: +49-6131-19240

## Einleitung

Das Investigator ESSplex SE Plus Kit ist für Multiplex-PCR in der forensischen Fallarbeit bestimmt. Die 15 polymorphen STR-Marker, die vom Europäischen Netz der kriminaltechnischen Institute (ENFSI) und der Europäischen Gruppe für DNA-Profilierung (EDNAP) als der neue Europäische Standardsatz (D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA [FIBRA], TH01 [TC11] und vWA) empfohlen werden, plus SE33 [ACTBP2] und das geschlechtsspezifische Amelogenin werden simultan amplifiziert.

Das Investigator ESSplex SE Plus Kit wurde speziell zur schnellen und zuverlässigen Erstellung von DNA-Profilen aus Blut, Mundschleimhautabstrichen und forensischen Flecken entwickelt. Das Kit setzt die schnelle PCR-Technologie von QIAGEN ein, die eine Amplifikation in 90 Minuten und durch ihre inhibitorresistente Chemie höchst robuste Ergebnisse liefert. Die Primer sind mit einem der folgenden Farbstoffe fluoreszenzmarkiert:

6-FAM™: Amelogenin, TH01, D3S1358, vWA, D21S11

■ BTG: D16S539, D1S1656, D19S433, SE33

■ BTY: D10S1248, D22S1045, D12S391, D8S1179, D2S1338

■ BTR: D2S441, D18S51, FGA

Die bei Normalbedingungen empfohlene Menge DNA beträgt 0,5 ng. Interne Validierungen haben mit 0,2 bis 2 ng DNA robuste und ausgeglichene Ergebnisse und mit <0,1 ng DNA zuverlässige Ergebnisse gezeigt.

Das Investigator ESSplex SE Plus Kit wurde mit dem GeneAmp® PCR System 9700 (mit vergoldetem Silberblock mit 96 Vertiefungen) und dem Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer validiert.

Tabelle 1 zeigt die STR-Loci mit ihrer Chromosomenkartierung und wiederholten Motiven, die mit den Richtlinien der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG) für den Einsatz von Mikrosatellitenmarkern übereinstimmen (Bär et al., 1997). Die Nomenklatur für die STR-Loci D10S1248 und D22S1045 ist gemäß Hill et al. (2008).

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

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

## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS, material safety data sheets) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Hi-Di™ Formamid, 25 ml (Applied Biosystems, Katalog-Nr. 4311320)
- Matrix Standards BT5 für Einzelkapillarinstrumente, z. B. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (QIAGEN Katalog-Nr. 386113)
- Matrix Standards BT5 für Mehrkapillarinstrumente, 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-Analysatoren:  
ABI PRISM 310 Genetic 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:  
QIAGEN Rotor-Gene® Q  
GeneAmp PCR System 9700  
Bio-Rad PTC-200  
Biometra UNO-Thermoblock  
Eppendorf® Mastercycler® ep
- PCR-Röhrchen oder Platten

### Validitätsanalyse-Software für Produkte zur Humanidentifikation

Investigator Human Identification PCR Kits müssen mit einer Allelleiter kalibriert werden. Daher muss die verwendete Software kompatibel sein für Produkte zur Humanidentifikation (HID) für forensische Anwendungen. Wir empfehlen Investigator IDproof, Investigator IDproof Mixture, GeneMapper® ID, GeneMapper ID-X oder Genotyper® Software. Die Investigator Template Files unterstützen die Datenanalyse und sind mit der oben genannten Software verwendbar.



# Protokoll: PCR-Amplifikation

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

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Setze Sie alle Reaktionsmischungen in einem Bereich an, der von dem für die DNA-Isolierung und PCR-Produktanalyse (Post-PCR) abgetrennt ist.
- Verwenden Sie Einwegspitzen mit hydrophoben Filtern, um die Gefahr von Kreuzkontaminationen zu verringern.

## Vorbereitungen

- Vor dem Öffnen der Röhren mit den PCR-Komponenten müssen diese geschüttelt und dann kurz zentrifugiert werden, um den Inhalt auf dem Boden der Röhren zu sammeln.
- Die bei Normalbedingungen empfohlene Menge DNA beträgt 0,5 ng. Interne Validierungen haben mit 0,2 bis 2 ng DNA robuste und ausgeglichene Ergebnisse und mit <0,1 ng DNA zuverlässige Ergebnisse gezeigt.

## Durchführung

### 1. Tauen Sie die PCR-Komponenten und Template-Nukleinsäure auf.

Vor Gebrauch gut mischen.

### 2. Bereiten Sie einen Master-Mix gemäß Tabelle 2 vor.

Der Master-Mix enthält alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden, außer der Template-(Proben)-DNA und nukleasefreies Wasser.

Setzen Sie 10 % mehr Master-Mix an, als für die Gesamtzahl der PCR-Reaktionen benötigt wird. Dies sollte positive und negative Kontrollreaktionen einschließen.

### 3. Mischen Sie den Master-Mix gründlich, und geben Sie entsprechende Volumina in PCR-Röhren oder in die Vertiefungen einer PCR-Platte.

### 4. Setzen Sie Template-DNA und nukleasefreies Wasser zum Master-Mix hinzu, so dass das Endprobenvolumen 25 µl beträgt.

### 5. Bereiten Sie positive und negative Kontrollproben vor.

Positivkontrolle: Verwenden Sie 5 µl Kontroll-DNA.

Negativkontrolle: Verwenden Sie für die Reaktion nukleasefreies Wasser statt Template-DNA.

**Tabelle 2. Reaktionsansatz**

Komponente	Volumen pro Reaktion
Fast Reaction Mix (Schnelle Reaktionsmischung)	7,5 µl
Primermischung	2,5 µl
Nukleasefreies Wasser (wird in Schritt 4 hinzugefügt)	Variabel
Template-DNA (wird in Schritt 4 hinzugefügt)	Variabel
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

**6. Mischen Sie die Reaktionen gründlich.**

Damit Sie optimale Ergebnisse erzielen, mischen Sie die vorbereitete und verschlossene PCR-Platte vor der Amplifikation mit einem Eppendorf Thermomixer Comfort (Horizontalschüttler) für 5 min bei 1.200 U/min bei Raumtemperatur. Schütteln Sie andauernd und ohne Pausen.

**7. Programmieren Sie den Thermocycler nach den Anweisungen des Herstellers, wobei Sie die Bedingungen wählen, die in Tabelle 3 angegeben sind.**

**Hinweis:** Mit dem GeneAmp PCR System 9700 mit einem Aluminiumblock verwenden Sie „Std Mode“ (Standardmodus), oder mit einem Silberblock mit 96 Vertiefungen oder mit einem vergoldeten Silberblock mit 96 Vertiefungen verwenden Sie „Max Mode“ (Maximalmodus). Verwenden Sie nicht „9600 Emulation Mode“ (9600 Emulationsmodus).

**Tabelle 3. Standard-Cycler-Protokoll, für alle DNA-Proben empfohlen**

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
95 °C*	5 min	
96°C	10 s	30 Zyklen
61°C	120 s	
10°C	∞	

\* Heiß am Anfang zum Aktivieren der DNA-Polymerase.

- 8. Nach Ende des Cycler-Protokolls lagern Sie die Proben vor Licht geschützt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , oder führen Sie die Elektrophorese sofort durch.**

# Protokoll: Elektrophorese mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Bitte schlagen Sie allgemeine Anweisungen zur Einstellung des Geräts, Matrixerzeugung und Anwendung der GeneScan® oder GeneMapper ID Software im Benutzerhandbuch *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer User's Manual* nach. Nachfolgend wird die Elektrophorese mit der GeneScan Software beschrieben.

Für eine kombinierte Applikation der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz G5 verwendet. Dieser Matrixstandard ist als BT5 bekannt.

Die für die Elektrophorese erforderlichen Materialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4. Für die Elektrophorese erforderliche Materialien**

<b>Material</b>	<b>Spezifikation</b>
Kapillare	47 cm/50 µm (grün)
„Polymer“	POP-4™ für ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Puffer	10x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA

## Matrixerzeugung

Vor der Längenanalyse der DNA-Fragmente mit dem Filtersatz G5, muss eine Matrix mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO erzeugt werden (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Die 5 Fluoreszenzmarker BT5**

<b>„Color“</b>	<b>Matrixstandard</b>
Blau (B)	6-FAM
Grün (G)	BTG
Gelb (Y)	BTY
Rot (R)	BTR
Orange (O)	BTO

1. Es müssen fünf Elektrophoreseläufe, einer für jeden Fluoreszenzmarker, durchgeführt werden, wobei die gleichen Bedingungen wie für die Proben und Alleleiten des Investigator ESSplex SE Plus Kits verwendet werden müssen, um geeignete Matrixdateien zu erzeugen (Tabelle 6).

**Tabelle 6. Matrixansatz für Einzelkapillarinstrumente (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)**

<b>Matrixprobe</b>	<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Matrixprobe 1	Hi-Di Formamid	12,0 µl
	Matrixstandard 6-FAM	1,0 µl
Matrixprobe 2	Hi-Di Formamid	12,0 µl
	Matrixstandard BTG	1,0 µl
Matrixprobe 3	Hi-Di Formamid	12,0 µl
	Matrixstandard BTY	1,0 µl
Matrixprobe 4	Hi-Di Formamid	12,0 µl
	Matrixstandard BTR	1,0 µl
Matrixprobe 5	Hi-Di Formamid	12,0 µl
	Matrixstandard BTO	1,0 µl

2. Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.
3. Schnellfrieren Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.
4. Beladen Sie das Tablett mit den Proben.
5. Erstellen Sie ein „Sample Sheet“ (Probenblatt) und geben Sie eine „Sample Designation“ (Probenbezeichnung) ein. Tabelle 7 zeigt die Injektionsliste zur Matrixerzeugung.

**Tabelle 7. Injektionsliste zur Matrixerzeugung**

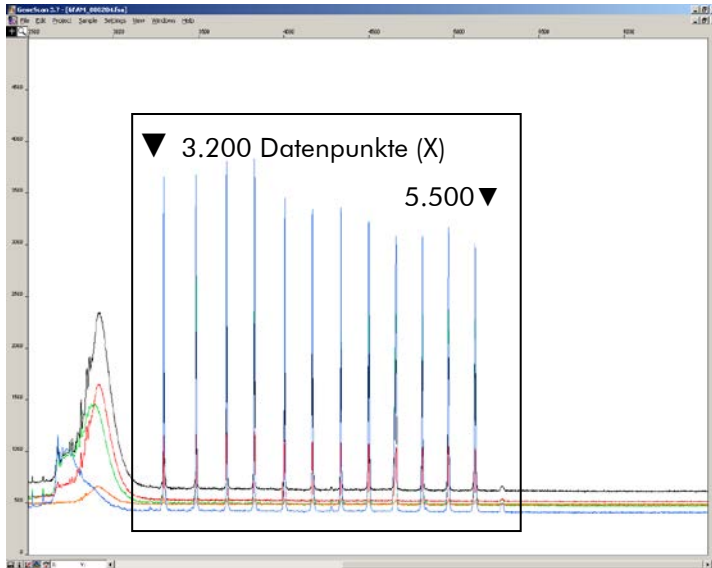
<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Module File	GS STR POP-4 (1 ml) G5
Matrix File	Keine
Size Standard	Keine*
Injection Time (s)	5
Injection Voltage (kV)	15
Run Voltage (kV)	15
Run Temperature (°C)	60
Run Time (min)	24

\* Bereiten Sie Matrixstandards stets ohne DNA-Längenstandard (BTO).

### **Analyse der Matrixproben**

- 1. Starten Sie die GeneScan Software.**
- 2. Wählen Sie „New“ (Neu) aus dem Menü „File“ (Datei) aus, und wählen Sie dann „Project“ (Projekt) aus.**
- 3. Öffnen Sie das Verzeichnis für den aktuellen Lauf und wählen Sie „Add Sample Files“ (Probendateien hinzufügen) aus.**
- 4. Wählen Sie eine Matrixprobe in der Spalte „Sample File“ (Probendatei) aus.**
- 5. Klicken Sie Sie auf „Sample“ (Probe) und dann auf „Raw Data“ (Rohdaten).**
- 6. Prüfen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Wie in der Abbildung gezeigt (nächste Seite), sollten mindestens 5 Peaks mit einer Peakhöhe von 1.000 bis 4.000 RFU für jede Matrixprobe vorhanden sein.**

**Hinweis:** Der optimale Bereich beträgt 2.000 bis 4.000 RFU.

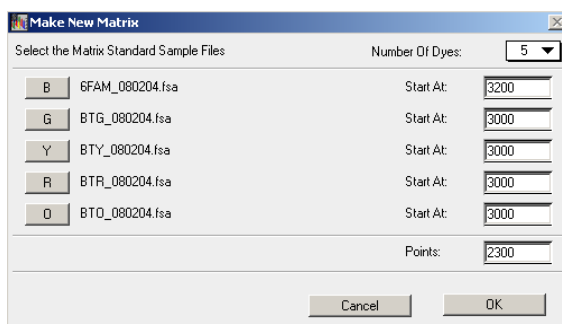


Elektropherogramm mit Rohdaten des Matrixstandards 6-FAM.

7. Wählen Sie einen Analysebereich mit einer flachen Basislinie, und injizieren Sie nötigenfalls die Matrixprobe erneut.
8. Zeichnen Sie den Start- und Endwert (Datenpunkte) des Analysebereichs auf; z. B. Startwert 3.200, Endwert 5.500.
9. Berechnen Sie die Differenz zwischen dem End- und dem Startwert; z. B.  $5.500 - 3.200 = 2.300$  Datenpunkte.

### Erzeugung einer Matrix

1. Wählen Sie „New“ aus dem Menü „File“ aus, und wählen Sie dann „Matrix“ aus.
2. Importieren Sie die Matrixproben für alle Farbstoffe (B, G, Y, R und O).
3. Geben Sie einen Wert für „Start At“ (Start bei) ein, z. B. 3.200.
4. Geben Sie unter „Points“ (Punkte) die berechnete Differenz zwischen den End- und dem Startwert ein, z. B. 2.300.
5. Klicken Sie auf „OK“, um die neue Matrix zu berechnen.



Auswahl einer Matrixprobe.

- Wählen Sie „Save as“ (Speichern als) im Menü „File“ aus, um die neue Matrix in dem Matrixverzeichnis zu speichern.

	B	G	Y	R	O
B	1.0000	0.1811	0.0051	0.0418	0.0006
G	0.6891	1.0000	0.2056	0.3259	0.0017
Y	0.4687	0.8068	1.0000	0.9119	0.0029
H	0.1944	0.3619	0.5311	1.0000	0.0095
O	0.0160	0.0304	0.0477	0.2082	1.0000

Neue Matrix BT5.

### Überprüfen der Matrix

- Um die neue Matrix mit aktuellen Proben zu prüfen, wählen Sie „New“ in dem Menü „File“ aus, und wählen Sie dann „Project“ aus.
- Öffnen Sie das Verzeichnis für den jeweiligen Lauf und wählen Sie „Add Sample Files“ aus.
- Wählen Sie die Probe(n) in der Spalte „Sample File“ aus.
- Klicken Sie auf „Sample“ und dann auf „Install New Matrix“ (Neue Matrix installieren), um das Matrixverzeichnis zu öffnen und die neue Matrix auszuwählen.
- Analysieren Sie die Proben erneut.

**Hinweis:** Es sollten keine Überstrahlungen zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R, O) mit der neuen Matrix auftreten.

### Probenvorbereitung

- Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard nach Tabelle 8 an.

**Tabelle 8. Ansetzen der Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard**

Komponente	Volumen pro Probe
Hi-Di Formamid	12,0 $\mu$ l
DNA-Längenstandard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

- Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12  $\mu$ l der Mischung in ein Röhrchen.



3. **Setzen Sie 1  $\mu$ l PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.**
4. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.**
5. **Schnellfrosteten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.
6. **Beladen Sie das Tablett mit den Proben.**

## Einstellen der GeneScan Software

Erstellen Sie ein „Sample Sheet“ und geben Sie die „Sample Designation“ ein

**Tabelle 9. Injektionsliste für den ABI PRISM 310 Genetic Analyzer**

Komponente	Einstellungen
Module File	GS STR POP-4 (1 ml) G5
Matrix File	z. B. Matrix BT5
Size Standard	z. B. SST-BTO_60-500bp
Injection Time (s)	5*
Injection Voltage (kV)	15
Run Voltage (kV)	15
Run Temperature (°C)	60
Run Time (min)	28 <sup>†</sup>

\* Abweichend von den Standardeinstellungen kann die Injektionsdauer in Abhängigkeit vom Typ der Probe zwischen 1 und 10 s liegen. Wenn Proben mit sehr hohen Signalintensitäten aufgezeichnet werden, kann eine kürzere Injektionsdauer ausgewählt werden. Für Proben mit geringem DNA-Gehalt kann eine Injektionsdauer von bis zu 10 s nötig sein.

<sup>†</sup> Die Laufzeit für Investigator ESSplex SE Plus wurde modifiziert, um in der Lage zu sein, Fragmente mit Längen von bis zu 500 bp zu analysieren.

## Analyseparameter

Tabelle 10 führt die empfohlenen Analyseparameter auf.

**Tabelle 10. Empfohlene Analyseparameter für den ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.**

Parameter	Einstellungen
Analysis Range	Start: 2.000 Stop: 10.000
Data Processing	Baseline: Markiert Multi-component: Markiert Smooth Options: Light
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 Punkte Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 Punkte <sup>†</sup>
Size Call Range	Min: 60 Max: 550
Size Calling Method	Local Southern Method
Split Peak Correction	Keine

\* Die Peakamplitudengrenze (Kappungswert) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneScan oder GeneMapper ID Software erkennt. Übliche Werte sind 50 bis 200 RFU und sollten individuell vom Labor bestimmt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte 3 mal höher sein als das Grundrauschen der Basislinie.

<sup>†</sup> Nur die Einstellung für „Peak Window Size“ weicht von den Standardeinstellungen von Applied Biosystems für die HID-Analyse ab.

**Hinweis:** Schlagen Sie Informationen zur Verwendung der empfohlenen „Template Files“ (als Analyseparameter) in dem passenden Investigator Template Files User Guide (Genotyper, GeneMapper ID oder GeneMapper ID-X) nach.

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

Schlagen Sie detaillierte Anweisungen zum Einstellen des Instrumentes, zur Spektralkalibrierung, zur Anwendung der ABI PRISM 3100 Data Collection Software, Version 1.01 oder 1.1 und der GeneScan Software im Benutzerhandbuch *ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer* nach.

Das System mit 4 Kapillaren ist der ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, und das System mit 16 Kapillaren ist der ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Für eine kombinierte Applikation der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz G5 verwendet. Dieser Matrixstandard ist als BT5 bekannt.

Die für die Elektrophorese erforderlichen Materialien sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11. Für die Elektrophorese erforderliche Materialien**

<b>Material</b>	<b>Spezifikation</b>
Kapillare	36 cm Capillary Array für ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Polymer	POP-4 Polymer für ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer
Puffer	10x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA

## Spektralkalibrierung/Matrixerzeugung

Eine sachgerechte Spektralkalibrierung ist kritisch für die Evaluierung von Multifarbsystemen mit dem ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer und sollte vor einer Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden. Der Kalibriervorgang erzeugt eine Matrix, die verwendet wird, um die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe zu korrigieren.

Die Spektralkalibrierung umfasst die folgenden Schritte:

- Vorbereiten der Spektralkalibrierstandards
- Beladen der Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen mit den Standards (eine Probe pro Kapillare)
- Eingeben der Plattenzusammensetzung
- Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung und Überprüfen der Matrix

## Vorbereiten der Spektralkalibrierstandards

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

1. Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 12 an.

**Tabelle 12. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 4 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	60 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	5 $\mu$ l

2. Beladen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen mit 12  $\mu$ l der Mischung; z. B. auf den Positionen A1 bis D1.
3. Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.
4. Schnellfrosteten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

### Beispiel für 16 Kapillaren (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer)

1. Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 13 an.

**Tabelle 13. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 16 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	204 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	17 $\mu$ l

2. Beladen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen mit 12  $\mu$ l der Mischung; z. B. auf den Positionen A1 bis H1 und A2 bis H2.
3. Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.
4. Schnellfrosteten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.

Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

## **Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung**

Die Parameterdatei für DyeSetG5 muss einmalig modifiziert werden, um eine erfolgreiche Kalibrierung mit der Data Collection Software, Version 1.0.1 oder 1.1, zu erzielen.

### **Spektralparameter**

- 1. Zum Ändern von Einstellungen in der Parameterdatei gehen Sie in das folgende Verzeichnis:  
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“ (Bereich der Zustandsgrenzen) auf [1,0, 20,0].**
- 4. Wenn die Kalibrierung nicht erfolgreich war, ändern Sie auch die „Sensitivity“ (Empfindlichkeit) auf 0,1 und die „Quality“ (Qualität) auf 0,8.**
- 5. Wählen Sie „Save As“ in dem Menü „File“ aus, und speichern Sie die Parameterdatei unter einem neuen Namen; z. B. MtxStd{Genescan\_SetG5\_BT5}.par.**  
**Hinweis:** Verwenden Sie diese Parameterdatei stets für Läufe zur Spektralkalibrierung mit QIAGEN Matrix Standard BT5.

### **„Plate Editor“ zur Spektralkalibrierung**

- 1. Stellen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen auf das Tablett des Autosamplers.**
- 2. Starten Sie die ABI PRISM 3100 Data Collection Software.**
- 3. Klicken Sie in der Ansicht „Plate“ auf „New“, um den Dialog „Plate Editor“ anzuzeigen.**
- 4. Geben Sie einen Namen für die Platte ein.**
- 5. Wählen Sie eine „Spectral Calibration“ (Spektralkalibrierung) aus.**
- 6. Wählen Sie als „Plate Type“ die Option „96-Well“ aus, und klicken Sie auf „Finish“.**

**Tabelle 14. „Plate Editor“ zur Spektralkalibrierung**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Sample Name	Geben Sie einen Namen für die Matrixproben ein
Dye Set	G5
Spectral Run Module (Spektrallaufmodul)	„Default“ (z. B. Spect36_POP4)
Spectral Parameters (Spektralparameter)	MtxStd{GeneScan_SetG5_BT5}.par (die zuvor erstellten Parameter)

- 7. Klicken Sie auf die Spaltenüberschrift, um die gesamte Spalte auszuwählen, und wählen Sie „Fill Down“ aus dem Menü „Edit“ aus, um die Informationen auf die ausgewählten Proben anzuwenden. Bestätigen Sie durch Klicken auf „OK“.**
- 8. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Tablett des Autosamplers mit der erstellten Platten-ID, und starten Sie den Lauf.**
- 9. Bei Beenden des Laufs überprüfen Sie im Dialog „Spectral Calibration Result“ (Ergebnis der Spektralkalibrierung), dass alle Kapillaren erfolgreich kalibriert werden konnten (Kennzeichen A).**  
Wenn individuelle Kapillaren mit X gekennzeichnet sind, schlagen Sie im *Benutzerhandbuch des ABI PRISM 3100-Avant/ 3100 Genetic Analyzers* nach.
- 10. Klicken Sie auf „OK“, um das Ende des Laufs zu bestätigen.**

### Überprüfen der Matrix

- 1. Wählen Sie „Display Spectral Calibration“ (Spektralkalibrierung anzeigen) aus dem Menü „Tools“ (Werkzeuge) aus und dann „Dye Set“ und „G5“, um das Spektralkalibrierprofil für jede Kapillare zu überprüfen.**
- 2. Der Qualitätswert (Q-Wert) muss größer sein als 0,95, und die Zustandszahl (C-Wert) muss zwischen 1 und 20 liegen. Beide Werte müssen innerhalb des vorbestimmten Bereichs liegen.**
- 3. Prüfen Sie, dass die Basislinie bei den Matrixproben flach ist. Bei jeder Matrixprobe sollten 5 Peaks mit einer Höhe von 1.000 bis 5.000 RFU auftreten.**

**Hinweis:** Der optimale Bereich beträgt 2.000 bis 4.000 RFU.

4. **Prüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Es sollten keine Überstrahlungen zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R und O) mit der neuen Matrix auftreten.**
5. **Wenn die Kalibrierung fehlgeschlagen ist, folgen Sie den Anweisungen im Abschnitt „Spektralparameter“ auf Seite 21.**
6. **Wenn alle Kapillaren die Kalibrierung bestanden haben, muss die letzte Kalibrierdatei für „Dye Set“ G5 manuell aktiviert werden. Klicken Sie auf „Set Active Spectral Calibration“ (Aktive Spektralkalibrierung einstellen) im Menü „Tools“.**
7. **Benennen Sie die Kalibrierdatei unter „Set Matrix Name“ (Matrixname einstellen) um (z. B. BT5\_Datum der Kalibrierung).**

## Probenvorbereitung

1. **Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard nach Tabelle 15 an.**

**Tabelle 15. Ansetzen der Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen pro Probe</b>
Hi-Di Formamid	12 $\mu$ l
DNA-Längenstandard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. **Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12  $\mu$ l der Mischung in ein Röhrchen.**
3. **Setzen Sie 1  $\mu$ l PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.**
4. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.**
5. **Schnellfrosteten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.
6. **Beladen Sie das Tablett mit den Proben.**

Da Injektionen auf allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen 4 oder 16 Proben auf die Platte von Mehrkapillaranalysegeräten pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12  $\mu$ l Hi-Di Formamid gefüllt werden.

Um eine zuverlässige Allelzuordnung auf Mehrkapillaranalysegeräten sicherzustellen, sollten mehrere Leitern durchgeführt werden.

Die Raumtemperatur kann die Leistung der PCR-Produkte auf Mehrkapillarinstrumenten beeinflussen, so dass Schulter-Peaks oder Split Peaks insbesondere bei niedrigen Temperaturen auftreten. Stellen Sie sicher, dass die Umgebungsbedingungen den Empfehlungen des Geräteherstellers entsprechen.

## **Einstellen der GeneScan Software**

- 1. Bearbeiten Sie das voreingestellte Laufmodul in Dye Set G5 einmalig für den ersten Lauf. Wählen Sie „Module Editor“ (Moduleditor) aus, um den Dialog anzuzeigen.**
- 2. Wählen Sie das geeignete „Run Module“ (Laufmodul) als Template aus der Tabelle GeneScan aus (siehe Tabelle 16).**
- 3. Modifizieren Sie die „Injection Voltage“ auf 3 kV und die „Injection Time“ auf 10 s.**
- 4. Klicken Sie auf „Save As“ und geben Sie den Namen des neuen Moduls ein (z. B. 3kV\_10s\_500bp). Bestätigen Sie durch Klicken auf „OK“.**
- 5. Klicken Sie auf „Close“, um den „Run Module Editor“ zu beenden.**



**Tabelle 16. „Run Module“ 3kV\_10s\_500bp für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Run Temperature (°C)	Default
Cap Fill Volume (Kapillarfüllvolumen)	Default
Maximum Current (Maximaler Strom) (A)	Default
Current Tolerance (Stromtoleranz) (A)	Default
Run Current (Laufstrom) (A)	Default
Voltage Tolerance (Spannungstoleranz) (kV)	Default
Pre-Run Voltage (kV)	Default
Pre-Run Time (s)	Default
Injection Voltage (kV)	3,0
Injection Time (s)	10*
Run Voltage (kV)	Default
Number of Steps (Anzahl der Schritte)	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time (s)	Default
Run Time (min)	26 <sup>†</sup>

\* Abweichend von den Standardeinstellungen kann die Injektionsdauer in Abhängigkeit vom Typ der Probe zwischen 1 und 20 s liegen. Wenn Proben mit sehr hohen Signalintensitäten aufgezeichnet werden, kann eine kürzere Injektionsdauer ausgewählt werden. Für Proben mit geringem DNA-Gehalt kann eine Injektionsdauer von bis zu 20 s nötig sein.

<sup>†</sup> Die Laufzeit für Investigator ESSplex SE Plus wurde modifiziert, um in der Lage zu sein, Fragmente mit Längen von bis zu 500 bp zu analysieren.

## **Starten des Laufs**

- 1. Stellen Sie die vorbereitete Platte mit 96 Vertiefungen auf das Tablett des Autosamplers.**
- 2. Starten Sie die ABI PRISM 3100 Data Collection Software.**

3. Klicken Sie in der Ansicht „Plate“ auf „New“, um den Dialog „Plate Editor“ anzuzeigen.
4. Geben Sie einen Namen für die Platte ein.
5. Wählen Sie „GeneScan“ als den Anwendungstyp aus.
6. Wählen Sie als „Plate Type“ die Option „96-Well“ aus, und klicken Sie auf „Finish“.

**Tabelle 17. Einstellungen im „Plate Editor“**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Sample Name	Geben Sie einen Namen für die Matrixproben ein
Dyes	<input type="radio"/>
Color Info (Farbinformationen)	Leiter oder Probe
Project Name (Projektname)	z. B. 3100_Project1
Dye Set	G5
Run Module	3kV_10s_500bp*
Analysis Module 1 (Analysemodul 1)	DefaultAnalysis.gsp

\* Siehe Tabelle 16, „Run Module“ 3kV\_10s\_500bp für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer“.

7. Vervollständigen Sie die Tabelle im „Plate Editor“, und klicken Sie auf „OK“.
8. Klicken Sie auf die Spaltenüberschrift, um die gesamte Spalte zu unterlegen, und wählen Sie „Fill Down“ aus dem Menü „Edit“ aus, um die Informationen auf die ausgewählten Proben anzuwenden.
9. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Tablett des Autosamplers mit der erstellten Platten-ID, und starten Sie den Lauf.
10. Zeigen Sie nach Beenden des Laufs die Daten als „Color Data“ (Farbdaten) in der Ansicht „Array“ der 3100 Data Collection Software oder als „Analyzed Sample Files“ (Analysierte Probendateien) unter D:/AppliedBio/3100/DataExtractor/ExtractRuns an.

## Analyseparameter

Tabelle 18 führt die empfohlenen Analyseparameter auf.

**Tabelle 18. Empfohlene Analyseparameter für den ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer**

Parameter	Einstellungen
Analysis Range	Start: 2.000 Stop: 10.000
Data Processing	Baseline: Markiert Multi-component: Markiert Smooth Options: Light
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 Punkte Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 Punkte <sup>†</sup>
Size Call Range	Min: 60 Max: 550
Size Calling Method	Local Southern Method
Split Peak Correction	Keine

\* Die Peakamplitudengrenze (Kappungswert) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneScan oder GeneMapper *ID* Software erkennt. Übliche Werte sind 50 bis 200 RFU und sollten individuell vom Labor bestimmt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte 3 mal höher sein als das Grundrauschen der Basislinie.

<sup>†</sup> Nur die Einstellung für „Peak Window Size“ weicht von den Standardeinstellungen von Applied Biosystems für die HID-Analyse ab.

**Hinweis:** Schlagen Sie Informationen zur Verwendung der empfohlenen „Template Files“ (als Analyseparameter) in dem passenden Investigator Template Files User Guide (Genotyper, GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X*) nach.

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

Schlagen Sie detaillierte Anweisungen zum Einstellen des Instrumentes, zur Spektralkalibrierung oder zur Anwendung der ABI PRISM Data Collection Software, Version 3.0, und der GeneMapper ID Software im Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers Getting Started Guide nach.

Das System mit 4 Kapillaren ist der Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, und das System mit 16 Kapillaren ist der Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer.

Für eine kombinierte Applikation der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz Any5Dye verwendet. Dieser Matrixstandard ist als BT5 bekannt.

Die für die Elektrophorese erforderlichen Materialien sind in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19. Für die Elektrophorese erforderliche Materialien**

<b>Material</b>	<b>Spezifikation</b>
Kapillare	36 cm Capillary Array für Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Polymer	POP-4 Polymer für Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
Puffer	10x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA

## Spektralkalibrierung/Matrixerzeugung

Vor der Längenanalyse der DNA-Fragmente muss für jedes Analysegerät eine Spektralkalibrierung mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO durchgeführt werden. Der Kalibriervorgang erzeugt eine Matrix, die verwendet wird, um die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe zu korrigieren.

Die Spektralkalibrierung umfasst die folgenden Schritte:

- Vorbereiten der Spektralkalibrierstandards
- Beladen der Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen mit den Standards (eine Probe pro Kapillare)
- Erstellen des Instrumentenprotokolls zur Spektralkalibrierung („Protocol Manager“ (Protokollmanager))

- Definieren der Plattenzusammensetzung im Platteneditor („Plate Manager“ (Plattenmanager))
- Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung und Überprüfen der Matrix

## Vorbereiten der Spektralkalibrierstandards

### Beispiel für 4 Kapillaren (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer)

1. **Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 20 an.**

**Tabelle 20. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 4 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	60 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	5 $\mu$ l

2. **Beladen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen mit 12  $\mu$ l der Mischung; z.B. auf den Positionen A1 bis D1.**
3. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95°C.**
4. **Schnellfrosteten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4°C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

### Beispiel für 16 Kapillaren (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer)

1. **Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 21 an.**

**Tabelle 21. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 16 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	204 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	17 $\mu$ l

2. **Beladen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen mit 12 µl der Mischung; z.B. auf den Positionen A1 bis H1 und A2 bis H2.**
3. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95°C.**
4. **Schnellfrosten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4°C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

### Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung

1. **Stellen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen auf das Tablett des Autosamplers.**
2. **Öffnen Sie im „Protocol Manager“ der Data Collection Software das Fenster „Instrument Protocol“ (Instrumentenprotokoll).**
3. **Klicken Sie auf „New“, um den Dialog „Protocol Editor“ (Protokolleditor) anzuzeigen.**
4. **Vervollständigen Sie den Dialog mit Informationen aus Tabelle 22, und klicken Sie auf „OK“.**

**Tabelle 22. Instrumentenprotokoll zur Spektralkalibrierung**

<b>„Protocol Editor“</b>	<b>Einstellungen</b>
Name	Benutzer (z. B., Spectral36_POP4_BT5)
Type	SPECTRAL
Dye Set	Any5Dye
Polymer	Benutzer (z. B. POP4)*
Array Length (Array-Länge)	Benutzer (z. B. 36 cm)*
Chemistry (Chemie)	Matrix Standard (Matrixstandard)
Run Module	Default (z. B. Spect36_POP4_1)*

\* Hängt vom verwendeten Polymertyp und der Länge der verwendeten Kapillare ab.

5. **Klicken Sie im „Plate Manager“ der Data Collection Software auf „New“, um den Dialog „New Plate“ (Neue Platte) anzuzeigen.**
6. **Geben Sie die Informationen aus Tabelle 23, und klicken Sie auf „OK“. Im „Plate Editor“ wird automatisch eine neue Tabelle angezeigt (Tabelle 24).**

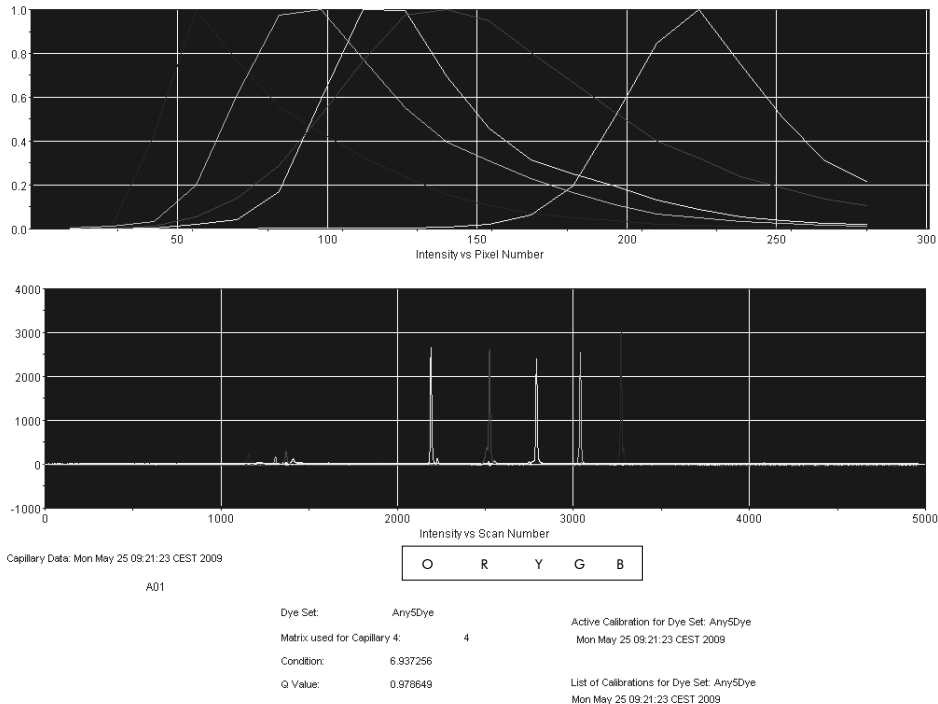
**Tabelle 23. „Plate Editor“ zur Spektralkalibrierung (I)**

<b>Dialog „New Plate“</b>	<b>Einstellungen</b>
Name	z. B. Spectral_BT5_Datum
Application	Spectral Calibration
Plate Type	96-Well
Owner Name/ Operator Name	

**Tabelle 24. „Plate Editor“ zur Spektralkalibrierung (II)**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Sample Name	Geben Sie einen Namen für die Matrixproben ein
Priority	z. B. 100
Instrument Protocol 1	Spectral36_POP4_BT5 (Einstellung oben beschrieben)

- 7. Klicken Sie auf die Spaltenüberschrift, um die gesamte Spalte auszuwählen, und wählen Sie „Fill Down“ aus dem Menü „Edit“ aus, um die Informationen auf die ausgewählten Proben anzuwenden. Bestätigen Sie durch Klicken auf „OK“.**
- 8. Verknüpfen Sie die Reaktionsplatte auf dem Tablett des Autosamplers mit der erstellten Platten-ID (Position A oder B), und starten Sie den Lauf.**



**Elektropherogramm einer Spektralkalibrierung mit Matrixstandard BT5 auf einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.**

## Überprüfen der Matrix

1. Der Qualitätswert (Q-Wert) jeder Kapillare muss größer sein als 0,95, und die Zustandszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen.
2. Prüfen Sie, dass die Basislinie bei den Matrixproben flach ist. Wie in der Abbildung auf der vorhergehenden Seite gezeigt, sollten bei jeder Matrixprobe 5 Peaks mit einer Höhe von 1.000 bis 5.000 RFU auftreten.  
Hinweis: Der optimale Bereich beträgt 2.000 bis 4.000 RFU.
3. Prüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Es sollten keine Überstrahlungen zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R, O) mit der neuen Matrix auftreten.
4. Wenn die Kalibrierung fehlschlägt, verwenden Sie die optimierten Werte des Matrixstandards BT5, und wiederholen Sie den Kalibrierlauf.
5. Wenn alle Kapillaren den Test bestanden haben, wird automatisch die letzte Kalibrierdatei für den „Dye Set“ Any5Dye im „Spectral Viewer“ (Spektralbetrachter) aktiviert. Benennen Sie die Kalibrierdatei um (z. B. BT5\_Datum der Kalibrierung).



## Probenvorbereitung

1. **Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard nach Tabelle 25 an.**

**Tabelle 25. Ansetzen der Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard**

Komponente	Volumen pro Probe
Hi-Di Formamid	12,0 $\mu$ l
DNA-Längenstandard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. **Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12  $\mu$ l der Mischung in ein Röhrchen.**
3. **Setzen Sie 1  $\mu$ l PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.**
4. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.**
5. **Schnellfrosten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4 °C zum Kühlen der Platte verwendet werden.
6. **Beladen Sie das Tablett mit den Proben.**

Da Injektionen auf allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen 4 oder 16 Proben auf die Platte von Mehrkapillaranalysegeräten pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12  $\mu$ l Hi-Di Formamid gefüllt werden.

Um eine zuverlässige Allelzuordnung auf Mehrkapillaranalysegeräten sicherzustellen, sollten mehrere Leitern durchgeführt werden.

Die Raumtemperatur kann die Leistung der PCR-Produkte auf Mehrkapillarinstrumenten beeinflussen, so dass Schulter-Peaks oder Split Peaks insbesondere bei niedrigen Temperaturen auftreten. Stellen Sie sicher, dass die Umgebungsbedingungen den Empfehlungen des Geräteherstellers entsprechen.

## Einstellen der Data Collection Software

1. **Bearbeiten Sie das „Run Module“ einmalig für den ersten Lauf. Klicken Sie im „Module Manager“ der Data Collection Software auf „New“, um den Dialog „Run Module Editor“ anzuzeigen.**

**Hinweis:** Modifizieren Sie die Standardeinstellungen für „Run Module“ aus „HIDFragmentAnalysis36\_POP4\_1“ entsprechend den in Tabelle 26 gezeigten Einstellungen.

2. **Modifizieren Sie die „Injection Voltage“ auf 3 kV und die „Injection Time“ auf 10 s (Tabelle 26).**
3. **Klicken Sie auf „Save As“, geben Sie einen Namen für das neue „Run Module“ ein (z.B. 3kV\_10s\_500bp) und bestätigen Sie, indem Sie auf „OK“ klicken.**
4. **Klicken Sie auf „Close“, um den „Run Module Editor“ zu beenden.**

**Tabelle 26. „Run Module“ 3kV\_10s\_500bp für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Oven Temperature (°C)	Default
Poly Fill Volume (Polymerfüllvolumen)	Default
Current Stability (Stromstabilität) (µA)	Default
Pre-Run Voltage (kV)	Default
Pre-Run Time (s)	Default
Injection Voltage (kV)	3,0
Injection Time (s)	10*
Voltage Number of Steps (Anzahl der Spannungsschritte)	Default
Voltage Step Interval	Default
Data Delay Time (s)	Default
Run Voltage (kV)	Default
Laufzeit (s)	1560 <sup>†</sup>

\* Abweichend von den Standardeinstellungen kann die Injektionsdauer in Abhängigkeit vom Typ der Probe zwischen 1 und 20 s liegen. Wenn Proben mit sehr hohen Signalintensitäten aufgezeichnet werden, kann eine kürzere Injektionsdauer ausgewählt werden. Für Proben mit geringem DNA-Gehalt kann eine Injektionsdauer von bis zu 20 s nötig sein.

<sup>†</sup> Die Laufzeit für Investigator ESSplex SE Plus wurde modifiziert, um in der Lage zu sein, Fragmente mit Längen von bis zu 500 bp zu analysieren.

## Starten des Laufs

1. Stellen Sie die vorbereitete Platte mit 96 Vertiefungen auf das Tablett des Autosamplers.
2. Öffnen Sie den „Protocol Manager“ der Data Collection Software.
3. Klicken Sie im Fenster „Instrument Protocol“ auf „New“, um den Dialog „Protocol Editor“ anzuzeigen, und geben Sie die Informationen in Tabelle 27 ein.
4. Klicken Sie auf „OK“, um den „Protocol Editor“ zu beenden.

**Tabelle 27. Einstellungen im „Instrument Protocol“**

Protocol Editor	Einstellungen
Name	Run36_POP4_BT5_26min
Type	REGULAR
Run Module	3kV_10s_500bp*
Dye Set	Any5Dye

\* Siehe Tabelle 26, „Run Module“ 3kV\_10s\_500bp für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer“.

1. Vor jedem Lauf muss eine Plattendefinition erstellt werden. Klicken Sie im „Plate Manager“ der Data Collection Software auf „New“, um den Dialog „New Plate“ anzuzeigen.
2. Geben Sie die Informationen in Tabelle 28 ein.

**Tabelle 28. GeneMapper „Plate Editor“ (I)**

Protocol Editor	Einstellungen
Name	z. B. Plate_BT5_Datum
Application	Wählen Sie die GeneMapper Anwendung aus
Plate Type	96-Well
Owner Name/ Operator Name	

3. Klicken Sie auf „OK“, und im „Plate Editor“ wird automatisch eine neue Tabelle angezeigt (Tabelle 29).

4. **Klicken Sie auf die Spaltenüberschrift, um die gesamte Spalte auszuwählen. Wählen Sie „Fill Down“ aus dem Menü „Edit“, um die Informationen auf alle ausgewählten Proben anzuwenden. Klicken Sie auf „OK“.**
5. **Klicken Sie im „Run Scheduler“ (Laufplaner) auf „Find All“ (Alle finden) und wählen Sie „Link“ (Verknüpfen) aus, um die Reaktionsplatte auf dem Tablett des Autosamplers mit dem neu erstellten Plattendatensatz zu verknüpfen (Position A oder B).**

**Tabelle 29. GeneMapper „Plate Editor“ (II)**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Sample Name	Geben Sie den Namen für die Proben ein.
Priority	z. B. 100 (Default)
Sample Type (Probentyp)	Sample oder Allelic Ladder
Size Standard	z. B. SST-BTO_60-500bp
Panel	z. B. ESSplex_SE_Plus_Panels
Analyseverfahren	z. B. Analysis_HID_3130
Snp Set (Snp Satz)	
Benutzerdefiniert 1-3	
Results Group 1 (Ergebnisgruppe 1)	(Wählen Sie eine Ergebnisgruppe aus)
Instrument Protocol 1	Run36_POP4_BT5_26min (Einstellung oben beschrieben)

6. **Starten Sie den Lauf.**
7. **Während des Laufs beobachten Sie den „Error Status“ (Fehlerstatus) im „Event Log“ (Ereignisprotokoll) oder untersuchen Sie die Qualität der Rohdaten für jede Kapillare im „Capillaries Viewer“ (Kapillarenbetrachter) oder im „Cap/Array Viewer“ (Kapillar-/Array-Betrachter).**
8. **Zeigen Sie die Daten als eine Übersicht in der „Run History“ (Laufhistorie) oder im „Cap/Array Viewer“ der Data Collection Software an.**

Die Daten des Laufs werden in dem „Run Folder“ (Laufverzeichnis) der zuvor ausgewählten „Result Group“ (Ergebnisgruppe) gespeichert.

## Analyseparameter/ Analyseverfahren

Tabelle 30 führt die empfohlenen Analyseparameter auf.

**Tabelle 30. Empfohlene Einstellungen für den Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer**

Parameter	Einstellungen
Peak Detection Algorithm	Advanced
Ranges	Analysis: Partial Range Start Point: 2.000; Stop Point: 10.000 Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light Baseline Window: 51 Punkte
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 Punkte Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 Punkte <sup>†</sup> Slope Thresholds: 0,0

\* Die Peakamplitudengrenze (Kappungswert) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneMapper ID Software erkennt. Übliche Werte sind 50 bis 200 RFU und sollten individuell vom Labor bestimmt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte 3 mal höher sein als das Grundrauschen der Basislinie.

† Nur die Einstellung für „Peak Window Size“ weicht von den Standardeinstellungen von Applied Biosystems für die HID-Analyse ab.

**Hinweis:** Schlagen Sie Informationen zur Verwendung der empfohlenen „Template Files“ (als Analyseparameter) in dem passenden Investigator Template Files User Guide (Genotyper, GeneMapper ID oder GeneMapper ID-X) nach.

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

Schlagen Sie detaillierte Anweisungen zum Einstellen des Instrumentes, zur Spektralkalibrierung oder zur Anwendung der Applied Biosystems 3500 Series Data Collection Software, Version 1.0, und der GeneMapper ID-X Software, Version 1.2, im Benutzerhandbuch *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* nach.

Das System mit 8 Kapillaren ist der Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, und das System mit 24 Kapillaren ist der Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer.

Für eine kombinierte Applikation der 5 Fluoreszenzmarker 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO wird der virtuelle Filtersatz AnyDye verwendet. Dieser Matrixstandard ist als BT5 bekannt.

Die für die Elektrophorese erforderlichen Materialien sind in Tabelle 31 aufgeführt.

**Tabelle 31. Für die Elektrophorese erforderliche Materialien**

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

## Spektralkalibrierung/Matrixerzeugung

Vor der Längenanalyse der DNA-Fragmente muss für jedes Analysegerät eine Spektralkalibrierung mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO durchgeführt werden (Tabelle 32). Der Kalibriervorgang erzeugt eine Matrix, die verwendet wird, um die Überlappung der Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe zu korrigieren.

**WICHTIG:** Für jedes neue Kapillar-Array mit einer Spektralkalibrierung durchgeführt werden.

Die Spektralkalibrierung umfasst die folgenden Schritte:

- Vorbereiten des Instrumentes

- Vorbereiten des Farbstoffsatzes BT5
- Vorbereiten der Standardkalibrierplatte
- Plattenmontage und Beladen der Platte in dem Instrument
- Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung
- Überprüfen der Matrix

### Vorbereiten des Instrumentes

Stellen Sie sicher, dass vor dem Spektralkalibriervorgang die räumliche Kalibrierung durchgeführt wurde. Dieser Vorgang ist detailliert beschrieben im Benutzerhandbuch *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*.

### Vorbereiten des Farbstoffsatzes BT5

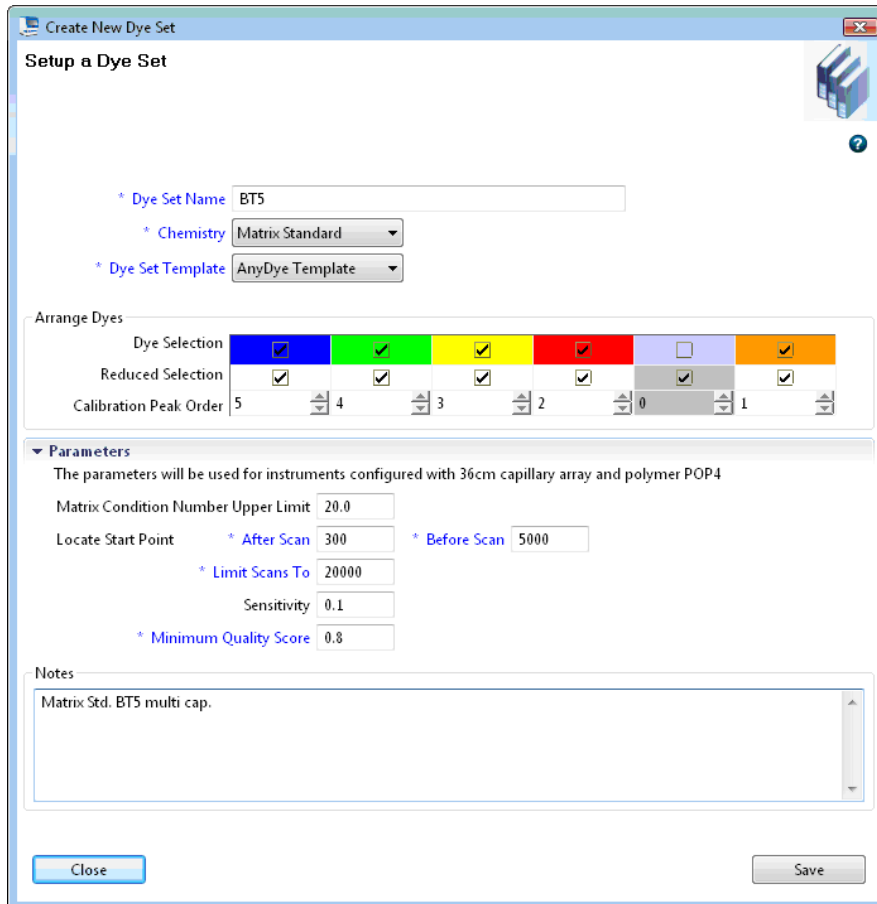
**Tabelle 32. Die 5 Fluoreszenzmarker BT5**

<b>Color</b>	<b>Matrixstandard</b>
Blau (B)	6-FAM™
Grün (G)	BTG
Gelb (Y)	BTY
Rot (R)	BTR
Orange (O)	BTO

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

1. **Um einen neuen Farbstoffsatz zu erstellen, gehen Sie zu „Library“ (Bibliothek) und wählen Sie „Analyze“ (Analysieren) gefolgt von „Dye Sets“ (Farbstoffsätze) aus, und klicken Sie auf „Create“ (Erstellen).**
2. **Geben Sie einen „Dye Set Name“ (Farbstoffsatznamen) ein, z.B. BT5.**
3. **Wählen Sie als eine Chemie „Matrix Standard“ und als ein Farbstoffsatz-Template „AnyDye Template“ aus.**
4. **Deaktivieren Sie „Purple“ (Purpur) im Feld „Arrange Dyes“ (Farbstoffe anordnen). Stellen Sie sicher, dass alle anderen Farben aktiviert sind.**

5. Unter „Calibration Peak Order“ (Kalibrierpeakfolge) müssen die Farben wie folgt angeordnet werden: 5 – blau, 4 – grün, 3 – gelb, 2 – rot und 1 – orange.
6. Lassen Sie die Einstellungen unter „Parameter“ unverändert.
7. Klicken Sie auf „Save“, um die Änderungen zu bestätigen.



Einrichten des Farbstoffsatzes BT5

## Vorbereiten der Standardkalibrierplatte

### Beispiel für 8 Kapillaren (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)

1. Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 33 an.



**Tabelle 33. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 8 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	90 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	10 $\mu$ l

- 2. Beladen Sie eine Platte mit 96 Vertiefungen mit 10  $\mu$ l der Mischung; z.B. auf den Positionen A1 bis H1.**
- 3. Denaturieren Sie für 3 min bei 95°C.**
- 4. Schnellfrosten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4°C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

**Beispiel für 24 Kapillaren (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer)**

- 1. Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 nach Tabelle 34 an.**

**Tabelle 34. Ansetzen der Mischung aus Formamid und Matrixstandard BT5 für 24 Kapillaren**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Hi-Di Formamid	225 $\mu$ l
Matrixstandard BT5 für Mehrkapillargeräte	25 $\mu$ l

- 2. Beladen Sie die Platte mit 96 Vertiefungen mit 10  $\mu$ l der Mischung; z.B. auf den Positionen A1 bis H1, A2 bis H2 und A3 bis H3.**
- 3. Denaturieren Sie für 3 min bei 95°C.**
- 4. Schnellfrosten Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4°C zum Kühlen der Platte verwendet werden.

**Plattenmontage und Beladen der Platte in dem Instrument**

Die nötigen Schritte sind detailliert beschrieben im Benutzerhandbuch *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide*.

## Durchführen eines Laufs zur Spektralkalibrierung

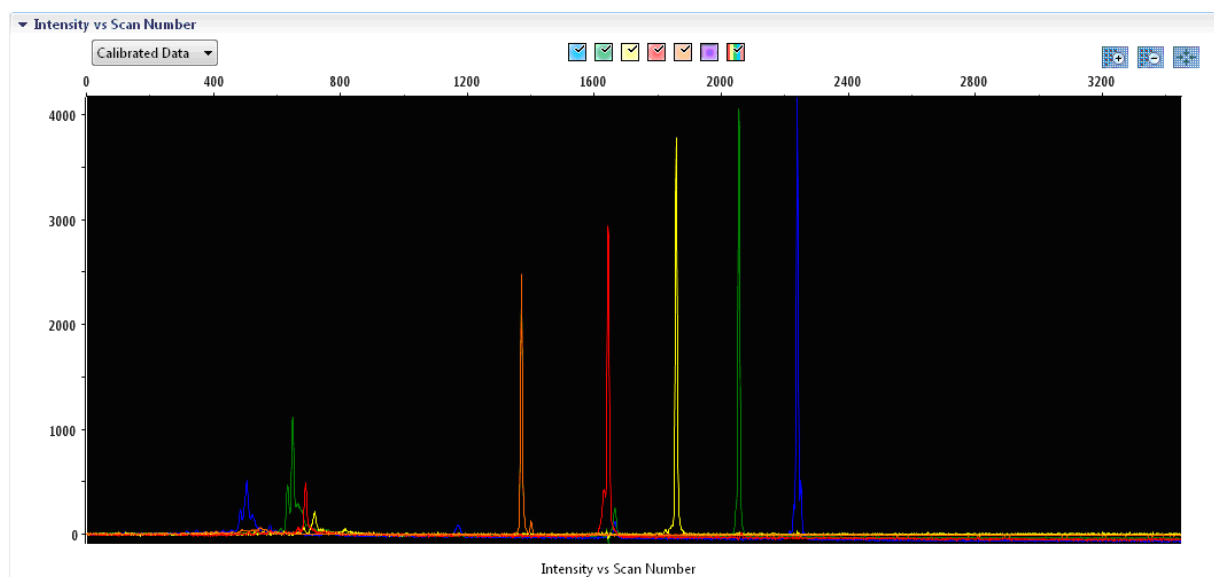
Wenn die Platten mit vielen Vertiefungen, welche die Mischung für die Spektralkalibrierung enthalten, auf dem Tablett des Autosamplers platziert wurden, kann der Spektralkalibriervorgang gestartet werden.

1. Um das Fenster „Spectral Calibration“ anzuzeigen, wählen Sie „Maintenance“ (Wartung) auf dem „Dashboard“ (Instrumententafel) der 3500 Series Data Collection Software aus.
2. Die Anzahl der Vertiefungen in der Spektralkalibrierplatte und ihr Ort in dem Instrument müssen angegeben werden.
3. Wählen Sie als einen Chemiestandard „Matrix Standard“ und für „Dye Set“ die Option „BT5“ aus.
4. (Optional) Aktivieren Sie „Allow Borrowing“ (Übernehmen ermöglichen).
5. Klicken Sie auf „Start Run“ (Lauf starten).

## Überprüfen der Matrix

Klicken Sie auf eine Kapillare in der Tabelle, um die Ergebnisse für die jeweilige Kapillare (Spektraldaten, „Quality Value“ [Qualitätswert] und „Condition Number“ [Zustandszahl]) unter der Ergebnistabelle für den Lauf anzuzeigen.

- Der Qualitätswert (Q-Wert) jeder Kapillare muss größer sein als 0,8 und die Zustandszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen.
- Prüfen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Wie in der Abbildung gezeigt, sollten 5 Peaks mit einer Peakhöhe von 1.000 bis 5.000 RFU für jede Matrixprobe vorhanden sein. (**Hinweis:** Der optimale Bereich beträgt 2.000 bis 4.000 RFU).



## Elektropherogramm einer Spektralkalibrierung des Matrixstandards BT5 auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Wenn eine Spektralkalibrierung erfolgreich beendet ist, zeigt die Zeile „Overall“ (Insgesamt) grüne Ergebnisse an. Wenn die Zeile „Overall“ rote Ergebnisse anzeigt, schlagen Sie den Abschnitt „spectral calibration troubleshooting“ im Benutzerhandbuch *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* nach.

▼ 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

Beispiel einer erfolgreichen Spektralkalibrierung des Matrixstandards 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. Prüfen Sie, dass die Daten die folgenden Kriterien erfüllen:

- Die Reihenfolge der Peaks in dem Spektralprofil von links nach rechts ist orange-rot-gelb-grün-blau
- In dem Rohdatenprofil sind keine zusätzlichen Peaks vorhanden
- Die Peakmorphologie in dem Spektralprofil zeigt keine groben Überlappungen, Senken oder andere Unregelmäßigkeiten. Es sollten getrennte und distinkte Peaks sichtbar sein

Wenn die Daten für alle Kapillaren die oben stehenden Kriterien erfüllen, klicken Sie auf „Accept Results“ (Ergebnisse akzeptieren). Wenn die Daten einer Kapillare die oben stehenden Kriterien nicht erfüllen, klicken Sie auf „Reject Results“ (Ergebnisse verwerfen), und schlagen Sie den Abschnitt „spectral calibration troubleshooting“ im Benutzerhandbuch *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzers User Guide* nach.

## Probenvorbereitung

1. **Setzen Sie eine Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard nach Tabelle 35 an.**

**Tabelle 35. Ansetzen der Mischung aus Formamid und DNA-Längenstandard**

Komponente	Volumen pro Probe
Hi-Di Formamid	12,0 $\mu$ l
DNA-Längenstandard 550 (BTO)	0,5 $\mu$ l

2. **Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12  $\mu$ l der Mischung in ein Röhrchen.**
3. **Setzen Sie 1  $\mu$ l PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.**
4. **Denaturieren Sie für 3 min bei 95 °C.**
5. **Schnellfrieren Sie die Platte, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.**  
Ersatzweise kann eine Thermocycler-Einstellung von 4°C zum Kühlen der Platte verwendet werden.
6. **Beladen Sie das Tablett mit den Proben.**

Da Injektionen auf allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, müssen 8 oder 24 Proben auf die Platte von Mehrkapillaranalysegeräten pipettiert

werden. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di Formamid gefüllt werden.

Um eine zuverlässige Allelzuordnung auf Mehrkapillaranalysegeräten sicherzustellen, injizieren Sie für jeden Satz von 24 Proben eine Allelleiter:

- 8-Kapillarinstrumente: Eine Allelleiter pro 3 Injektionen
- 24-Kapillarinstrumente: Eine Allelleiter pro 1 Injektion

Die Raumtemperatur kann die Leistung der PCR-Produkte auf Mehrkapillarinstrumenten beeinflussen, so dass Schulter-Peaks oder Split Peaks insbesondere bei niedrigen Temperaturen auftreten. Stellen Sie sicher, dass die Umgebungsbedingungen den Empfehlungen des Geräteherstellers entsprechen.

### Konfigurieren eines Laufs

Wenn Sie das Investigator ESSplex SE Plus Kit zum ersten Mal auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer verwenden, müssen Sie zuerst eine Anzahl von Protokollen einrichten:

- „Instrument Protocol“
- „Size Standard“
- „QC Protocol“ (Qualitätssicherungsprotokoll)
- „Assay“

Alle Protokolle können über die Instrumententafel der 3500 Series Data Collection Software eingerichtet werden.

- 1. Um das Instrumentenprotokoll einzurichten, gehen Sie zu „Library“ und wählen Sie „Analyze“ gefolgt von „Instrument Protocols“ aus, und klicken Sie auf „Create“.**

**Hinweis:** Modifizieren Sie die Standardeinstellungen für „Run Module“ aus „HID36\_POP4“, wie in Tabelle 36 gezeigt.

- 2. Die Parameter in Tabelle 36 müssen eingegeben oder ausgewählt werden.**

**Tabelle 36. Parameter für „Instrument Protocol“ für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Application Type	HID
Capillary Length	36 cm
Polymer	POP4
Dye Set	z.B. BT5
Run Module	HID36_POP4
Protocol Name	z.B. Investigator ESSplex SE Plus
Oven Temperature (°C)	Default
Run Voltage (kV)	Default
PreRun Voltage (Vorlaufspannung) (kV)	Default
Injection Voltage (kV)	3,0
Laufzeit (s)	1.300
PreRun Time (Vorlaufdauer) (s)	Default
Injection Time (s)	8,0*
Data Delay (Datenverzögerung) (s)	Default
Advanced Options (Erweiterte Optionen)	Default

\* Abweichend von den Standardeinstellungen kann die Injektionsdauer in Abhängigkeit vom Typ der Probe zwischen 1 und 20 s liegen. Wenn Proben mit sehr hohen Signalintensitäten aufgezeichnet werden, kann eine kürzere Injektionsdauer ausgewählt werden. Für Proben mit geringem DNA-Gehalt kann eine Injektionsdauer von bis zu 20 s nötig sein.

- 3. Klicken Sie auf „Save“, um die Änderungen zu bestätigen.**
- 4. Um den „Size Standard“ einzurichten, gehen Sie zu „Library“ und wählen Sie „Analyze“ gefolgt von „Size Standards“ aus, und klicken Sie auf „Create“.**
- 5. Die Parameter in Tabelle 37 müssen eingegeben oder ausgewählt werden.**

Der DNA-Längenstandard 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.

**Tabelle 37. Parameter für den „Size Standard“**

Parameter	Einstellung
Size Standard	z.B. SST-BTO_60-500bp
Dye Color (Farbstofffarbe)	Orange

6. Klicken Sie auf „Save“, um die Änderungen zu bestätigen.
7. Um das „QC Protocol“ einzurichten, gehen Sie zu „Library“ und wählen Sie „Analyze“ gefolgt von „QC Protocols“ aus, und klicken Sie auf „Create“.
8. Die Parameter in Tabelle 38 müssen eingegeben oder ausgewählt werden.

**Tabelle 38. Parameter für das „QC Protocol“**

Parameter	Einstellung
Protocol Name	z. B. BTO_550
Size Standard	SST-BTO_60-500bp (aus Schritt 4)
Sizecaller (Längenzuordnung)	SizeCaller v1.1.0

9. Gehen Sie zu „Analysis Settings“ (Analyseinstellungen) und dann zu „Peak Amplitude Threshold“ (Peakamplitudengrenze) und deaktivieren Sie „Purple“. Stellen Sie sicher, dass alle anderen Farben aktiviert sind.  
Überprüfen Sie die empfohlenen Analyseinstellungen in Tabelle 41. Alle anderen Einstellungen sollten auf „Default“ bleiben.
10. Klicken Sie auf „Save“, um die Änderungen zu bestätigen.
11. Um ein „Assay“ einzurichten, gehen Sie zu „Library“ und wählen Sie „Manage“ (Verwalten) gefolgt von „Assays“ aus, und klicken Sie auf „Create“.

**12. Zum Analysieren von Fragmenten mit Investigator ESSplex SE Plus müssen die Parameter in Tabelle 39 ausgewählt werden.**

**Tabelle 39. „Assay“-Parameter**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Assay Name (Testbezeichnung)	z. B. Investigator ESSplex SE Plus
Color	Default
Application Type	HID
Instrument Protocol	z.B. Investigator ESSplex SE Plus (aus Schritt 1)
QC Protocols (Qualitätssicherungs- protokolle)	z.B. BTO_550 (aus Schritt 7)

**13. Klicken Sie auf „Save“, um die Änderungen zu bestätigen.**

#### **Starten des Laufs**

- 1. Klicken Sie auf dem „Dashboard“ auf „Create New Plate“ (Neue Platte erstellen).**
- 2. Gehen Sie zu „Define Plate Properties“ (Platteneigenschaften definieren) und wählen Sie „Plate Details“ (Plattendetails) aus. Wählen Sie die Parameter in Tabelle 40 aus, oder geben Sie diese dort ein.**

**Tabelle 40. Platteneigenschaften**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Einstellung</b>
Name	z. B. Investigator ESSplex SE Plus
Number of Wells (Anzahl der Vertiefungen)	96
Plate Type	HID
Capillary Length	36 cm
Polymer	POP4



3. **Klicken Sie auf „Assign Plate Contents“ (Platteninhalt zuordnen), um die Änderungen zu bestätigen.**
4. **Geben Sie den vorgesehenen Probenamen für jede Vertiefung ein, die eine Probe oder Allelleiter enthält. Dies identifiziert die Positionen der Vertiefungen aller Proben für die Datengewinnung und Datenverarbeitung.**
5. **Wählen Sie das korrekte Assay für die Analyse aus. Wenn Sie den Schritten unter „Konfigurieren eines Laufs“ gefolgt sind, wäre dies Investigator ESSplex SE Plus aus Schritt 11. Alle benannten Vertiefungen auf der Platte müssen ein zugeordnetes Assay aufweisen.**
6. **Wählen Sie die Vertiefungen aus, für die ein Assay angegeben werden soll. Markieren Sie das Kontrollkästchen neben dem Assay, um ihn den ausgewählten Vertiefungen zuzuordnen.**
7. **(Optional) Wiederholen Sie dies für die Dateinamenskonventionen und die Ergebnisgruppe.**
8. **Falls noch nicht geschehen, laden Sie die montierte Platte in das Instrument, und schließen Sie die Gerätetür, um das Instrument erneut zu initialisieren. Klicken Sie dann auf „Link Plate for Run“ (Platte für Lauf verknüpfen). Geben Sie im nächsten Fenster den gewünschten „Run Name“ (Laufname) ein und klicken Sie auf „Start Run“.**

## **Analyseparameter/ Analyseverfahren**

Tabelle 41 führt die empfohlenen Analyseparameter im Arbeitsblatt „Peak Detector“ (Peakdetektor) auf.

**Tabelle 41. Empfohlene Einstellungen für den Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Peak Detection Algorithm	Advanced
Ranges	Analysis: Partial Range Start Point: 1.000; Stop Point: 20.000 Sizing: All Sizes
Smoothing and Baselineing	Smoothing: Light Baseline Window: 51 Punkte
Size Calling Method	Local Southern Method
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width: 2 Punkte Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 11 Punkte <sup>†</sup> Slope Thresholds: 0,0

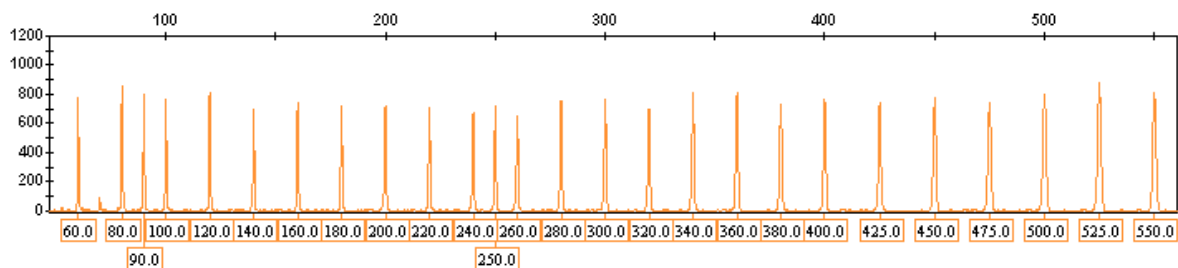
\* Die Peakamplitudengrenze (Kappungswert) ist die minimale Peakhöhe, welche die GeneMapper *ID-X* Software, Version 1.2 erkennt. Übliche Werte sind 50 bis 200 RFU und sollten individuell vom Labor bestimmt werden. Empfehlung: Die minimale Peakhöhe sollte drei mal höher sein als das Grundrauschen der Basislinie.

<sup>†</sup> Nur die Einstellung für „Peak Window Size“ weicht von den Standardeinstellungen von Applied Biosystems für die HID-Analyse ab.

## Protokoll: Analyse

Schlagen Sie allgemeine Anweisungen für eine automatische Probenanalyse in dem passenden Benutzerhandbuch und/oder in der Ablauffanleitung für die Investigator IDproof Software, Investigator IDproof Mixture Software, GeneScan, GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X* Software nach.

Die Ermittlung der genauen Längen der amplifizierten Produkte hängt vom Gerätetyp, den Bedingungen der Elektrophorese sowie dem verwendeten DNA-Längenstandard ab. Aufgrund der Komplexität einiger Loci sollte die Längenbestimmung auf gleichmäßig verteilten Referenzen basieren. Der DNA Size Standard 550 (BTO; Abbildung 1) 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 1. Elektropherogramm des DNA-Längenstandards 550 (BTO), Fragmentlängen in bp.**

## Analysesoftware

Die Allelzuordnung muss mit einer geeigneten Analysesoftware durchgeführt werden, z. B. QIAGEN Investigator IDproof oder IDproof Mixture Software oder Genotyper, GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X* Software zusammen mit den Investigator Template Files, die als Download von [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oder auf einer CD-ROM (Katalog-Nr. 389900) verfügbar sind, siehe Tabelle 42 und Tabelle 43.

Der empfohlene Investigator Template File für die Genotyper Software ist ESSplex SE.

**Tabelle 42. Empfohlene Investigator Template Files für GeneMapper ID**

<b>Dateityp</b>	<b>Dateiname</b>
Panels	ESSplex_SE_Plus_Panels
BinSets	ESSplex_SE_Plus_Bins
Längenstandard	SST-BTO_60–500bp
Analyseverfahren	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu
„Plot Settings“ (Plot-Einstellungen)	Plots_5dyes
„Table Settings“ (Tabelleneinstellungen)	Tabelle für 2 Allele Tabelle für 10 Allele

Panels und BinSets müssen stets verwendet werden; andere Template Files sind optional.

**Tabelle 43. Empfohlene Investigator Template Files für GeneMapper ID-X**

<b>Dateityp</b>	<b>Dateiname</b>
Panels	ESSplex_SE_Plus_Panels_x
BinSets	ESSplex_SE_Plus_Bins_x
Stutter	ESSplex_SE_Plus_Stutter_x
Längenstandard	SST-BTO_60–500bp
Analyseverfahren	Analysis_HID_310 Analysis_HID_3130 Analysis_HID_310_50rfu Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3500
„Plot Settings“ (Plot-Einstellungen)	Plots_5dyes
„Table Settings“ (Tabelleneinstellungen)	310 Data Analysis/31xx Data Analysis

Panels und BinSets müssen stets verwendet werden; andere Template Files sind optional.

## Kontrollen

Die in Tabelle 44 aufgeführten Allele repräsentieren die Kontroll-DNA 9948 (im Investigator ESSplex SE Plus Kit enthalten) und DNA von anderen im Handel erhältlichen Standardzelllinien.

**Tabelle 44. Allelzuordnung des Investigator ESSplex SE Plus Kits**

<b>Locus</b>	<b>CCR 9948</b>	<b>CCR 9947A</b>	<b>ATCC K-562</b>	<b>CCR 3657</b>
Amelogenin	X/Y	X/X	X/X	X/Y
D1S1656	14/17	18.3/18.3	15/16	13/18.3
D2S441	11/12	10/14	10/14	14/14
D2S1338	23/23	19/23	17/17	18/22
D3S1358	15/17	14/15	16/16	16/18
D8S1179	12/13	13/13	12/12	15/16
D10S1248	12/15	13/15	12/12	14/16
D12S391	18/24	18/20	23/23	18/19
D16S539	11/11	11/12	11/12	13/13
D18S51	15/18	15/19	15/16	12/20
D19S433	13/14	14/15	14/14,2	13/14
D21S11	29/30	30/30	29/30/31	28/29
D22S1045	16/18	11/14	16/16	11/17
FGA	24/26	23/24	21/24	18/23
SE33	23.2/26.2	19/29.2	26.2/28.2	22.2/27.2
THO1	6/9,3	8/9.3	9.3/9.3	7/9.3
vWA	17/17	17/18	16/16	14/19

Zur weiteren Bestätigung zeigt die oben stehende Tabelle die Allele der Referenz-DNA, die von Coriell Cell Repositories (CCR) erworben wurde, sowie 3 Referenz-DNAs, die von CCR und ATCC nach dem Standard von Szibor et al. (2003) erworben wurden.

## **Allele**

Tabelle 45 zeigt die Allele der Allelleiter. Alle Analysen wurden mit POP-4 Polymer durchgeführt (Abbildung 2 und Abbildung 3). Verschiedene Analyseinstrumente, DNA-Längenstandards oder Polymere können zu verschiedenen Fragmentlängen führen. Zusätzlich wird eine visuelle Ausrichtung mit der Allelleiter empfohlen.

## **Skalierung**

- Horizontal: 70 bis 480 bp
- Vertikal: Abhängig von der Signalintensität

**Tabelle 45. Allelleiterfragmente, die im Investigator ESSplex SE Plus Kit enthalten sind**

<b>Locus</b>	<b>Farbstoffmarker</b>	<b>Anzahl der Allelleiter-Wiederholungen</b>
Amelogenin	6-FAM™	X, Y
TH01	6-FAM™	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,3, 10, 10,3, 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
D21S11	6-FAM™	24, 24,2, 25, 26, 26,2, 27, 28, 28,2, 29, 29,2, 30, 31, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 34,2, 35, 36, 36,2, 37
D16S539	BTG	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
D1S1656	BTG	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 17,3, 18,3, 19,3
D19S433	BTG	6,2, 10, 11, 12, 12,2, 13, 13,2, 14, 14,2, 15, 15,2, 16, 16,2, 17, 17,2
SE33	BTG	6,3, 9, 10, 11, 12, 13, 13,2, 14, 15, 16*, 17, 18, 18,2, 19, 19,2, 20, 20,2, 21, 21,2, 22,2, 23,2, 24,2, 25, 25,2, 26,2, 27,2*, 28,2, 29,2, 30,2, 31,2, 32, 32,2, 33, 33,2, 34, 35, 36, 36,2, 37, 38, 49
D10S1248	BTY	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D22S1045	BTY	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D12S391	BTY	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26

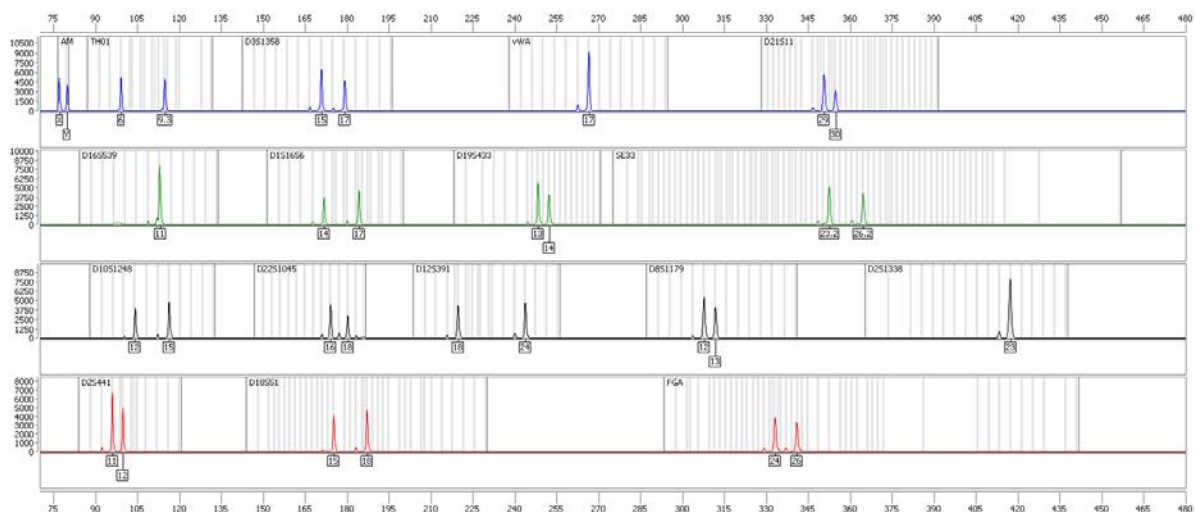
Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Locus	Farbstoffmarker	Anzahl der Allelleiter-Wiederholungen
D8S1179	BTY	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D2S1338	BTY	14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
D2S441	BTR	8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D18S51	BTR	8, 9, 10, 10,2, 11, 12, 13, 14, 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, 19, 20, 21, 21,2, 22, 23, 23,2, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30,2, 31,2, 33, 34, 37,2, 42,2, 44,2, 45,2, 47,2, 50,2

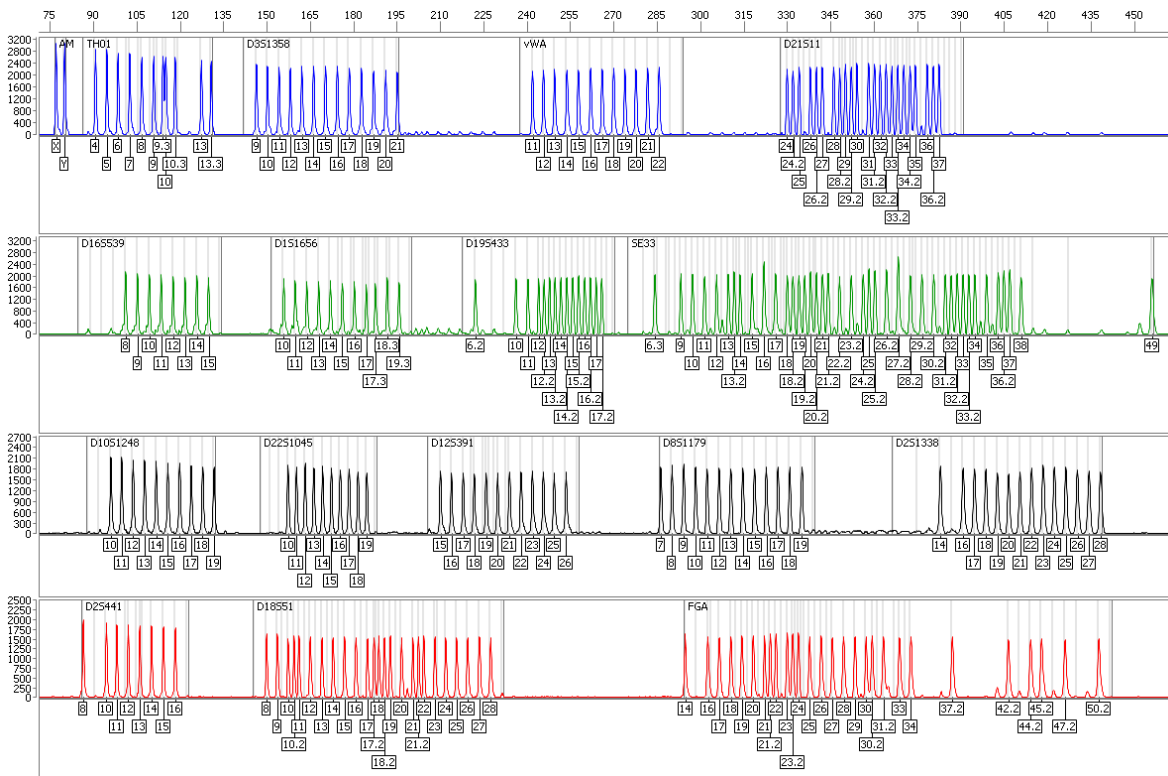
\* Allele sind innerhalb der Allelleiter zur besseren Orientierung erhöht.

Information über bekannte Mikrovarianten, die nicht in der Investigator ESSplex SE Plus Allelleiter enthalten sind, finden Sie auf der Internetseite des National Institute of Standards and Technology (NIST) unter (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>).



**Abbildung 2. Elektropherogramm des Investigator ESSplex SE Plus Kits mit 500 pg Kontroll-DNA 9948.** Die Analyse wurde auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Allelzuordnung wurde mit der Investigator IDproof Software durchgeführt.





**Abbildung 3. Elektropherogramm der Allelleiter ESSplex SE Plus, die auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer analysiert wurde. Die Allelzuordnung wurde mit der Investigator IDproof Software durchgeführt.**

## Interpretation der Ergebnisse

Die Post-PCR-Analyse und automatische Allelzuordnung mit einer geeigneten Analysesoftware stellt eine präzise und zuverlässige Unterscheidung der Allele sicher.

### Allgemeines Verfahren für die Analyse

1. **Prüfen Sie den DNA-Längenstandard.**
2. **Prüfen Sie die Allelleiter.**
3. **Prüfen Sie die Positivkontrolle.**
4. **Prüfen Sie die Negativkontrolle.**
5. **Analysieren und interpretieren Sie die Probandaten.**

### Überstrahlungen

Überstrahlungen können auftreten, wenn die Peakhöhen außerhalb des linearen Erfassungsbereichs liegen (siehe „Hilfe zur Fehlersuche“, Seite 60) oder wenn eine nicht korrekte Matrix angewandt wurde. Sie erscheinen an den Positionen spezifischer Peaks in anderen Farbkanäle in der Regel mit niedrigeren Signalintensitäten. Die Peakhöhen sollten 3.000 RFU nicht überschreiten, um Überstrahlungen zu verhindern.

### Stotterpeaks

Das Auftreten von Stotterpeaks hängt von der Sequenz der Wiederholungsstruktur und der Anzahl der Allele ab.  $n - 4$  Peaks werden durch einen Verlust einer Wiederholungseinheit während der Amplifikation von tetranukleotiden STR-Motiven verursacht, der wiederum durch Schlupfeffekte der *Taq* DNA-Polymerase verursacht wird, wogegen  $n - 3$  Peaks besonders während der Amplifikation des trinukleotiden STR-Motivs D22S1045 erscheinen. Diese Peaks sollten mit den Investigator Template Files für die Genotyper, GeneMapper ID und GeneMapper ID-X Software interpretiert werden.

### Vom Template unabhängige Addition von Nukleotiden

Wegen ihrer terminalen Transferase-Aktivität kann die *Taq* DNA Polymerase eine unvollständige Adenylierung an dem 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments verursachen. Der Artefaktpeak ist eine Base kürzer als erwartet ( $-1$  Peaks). Alle im Investigator ESSplex SE Plus Kit enthaltenen Primer sind zur Minimierung dieser Artefakte ausgelegt. Die Peakhöhe des Artefakts korreliert mit der DNA-Menge. Laboratorien sollten ihre eigenen Grenzen für die Peakanalyse definieren.

## **Artefakte**

Die Raumtemperatur kann die Leistung der PCR-Produkte auf Mehrkapillarinstrumenten beeinflussen, so dass Schulter-Peaks oder Split Peaks auftreten. Wenn Schulter-Peaks oder Split Peaks auftreten, empfehlen wir erneutes Injizieren der Probe.

## Hilfe zur Fehlersuche

In diesem Kapitel finden Sie nützliche Hinweise, die Ihnen bei der Lösung eventuell auftretender Probleme helfen können. Weitere Informationen finden Sie auch auf der „Frequently Asked Questions“-Seite unseres Support-Centers unter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Außerdem beantworten die Wissenschaftler des Technischen Services bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und Protokollen in diesem Handbuch sowie zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme finden Sie auf der Rückseite dieses Handbuchs und im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Kommentare und Vorschläge

---

#### Probenvorbereitung

Die Probensignalintensität muss erhöht werden

Reduzieren Sie das Volumen des DNA-Längenstandards 550 (BTO) auf Peakhöhen von ungefähr 500 RFU.

Reinigen Sie die PCR-Produkte vor der Analyse auf. Wir empfehlen das MinElute® PCR Purification Kit zur schnellen und effektiven Aufreinigung (siehe Bestellinformationen).

#### Die Matrix/ Spektralkalibrierung ist nicht passend

Es treten Überstrahlungen zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R, O) mit der aktuellen Matrix/ Spektralkalibrierung auf

Diese Matrix kann nicht für die Analyse verwendet werden. Wiederholen Sie die Matrixerzeugung/Spektralkalibrierung. Achten Sie darauf, das richtige Protokoll für das spezifische Analyseinstrument genau zu befolgen.

#### Viele Peaks sind als OL-Allele („Off-Ladder“) in den Proben markiert

a) Der DNA-Längenstandard 550 (BTO) wurde nicht definiert oder nicht korrekt identifiziert

Klicken Sie auf das orange Symbol „Size Match Editor“ (Längenabgleicheditor) in der oberen Symbolleiste der GeneMapper *ID* oder GeneMapper *ID-X* Software. Markieren Sie die orangenen Fragmente aller Proben.

Verwenden Sie stets den DNA-Längenstandard 550, der in den Investigator Human Identification PCR Kits enthalten ist.

## Kommentare und Vorschläge

---

- |   |   |
|---|---|
| b) Die Signalintensitäten sind zu hoch. Wenn die Peakhöhen der Proben außerhalb des linearen Erfassungsbereichs liegen (>4.000 RFU/<br>>5.000 *RFU)** , können Stotterpeaks, Split Peaks und Artefakte vermehrt auftreten | Reduzieren Sie die Injektionsdauer schrittweise auf ein Minimum von 1 s, reduzieren Sie die Produktmenge der PCR-Amplifikation für die Analyse oder reduzieren Sie die DNA-Menge für die PCR. |
| c) Blasen in der Kapillare führen zu Überstrahlungen in allen Farbtafeln („Spitzen“), die zu Fehlbenennungen der Allele führen  | Wiederholen Sie die Elektrophorese, um die Ergebnisse zu bestätigen.  |
| d) Unterschiede in der Laufleistung unter den Kapillaren eines Mehrkapillaranalysegeräts kann zu einer Verschiebung der Allelzuordnung führen   | Für eine zuverlässige Allelzuordnung auf Mehrkapillaranalysegeräten sollte eine Anzahl von Allelleitern ausgeführt werden.  |

---

\* >4.000 RFU for the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; >5.000 RFU for the ABI PRISM 3100 and Applied Biosystems 3130/3500 Genetic Analyzers.

## Kommentare und Vorschläge

---

### Eine Injektion/Datei der Allelleiter ist nicht ausreichend

- a) Ein zusätzliches Signal kann als Peak der Allelleiter aufgrund von Fehlfunktionen während der Elektrophorese identifiziert werden. Wenn Peaks der Allelleiter fälschlich zugeordnet werden, kann die Leiter nicht für die Analyse verwendet werden
- Verwenden Sie eine andere Injektion/Datei der Allelleiter, und prüfen Sie die Daten der analysierten Längen aus dem Längenstandard (in bp) der Allelleiter.
- Verwenden Sie stets den DNA-Längenstandard 550, der in den Investigator Human Identification PCR Kits enthalten ist.
- b) Ein Peak der Allelleiter liegt unter dem Peakerfassungswert (50 bis 200 RFU) des verwendeten Analyseverfahrens und wird somit nicht identifiziert
- Die Allelleiter muss in einer höheren Konzentration als die zu analysierenden Proben auf das Analysegerät geladen werden.
- Alternativ können Allelleiterdaten mit einem niedrigeren Peakerfassungswert in der Analysesoftware analysiert werden.
- c) Ein Peak der Allelleiter wird nicht identifiziert, weil er außerhalb des erwarteten Längenbereichs der Software (in bp) liegt
- Vergleichen Sie die Länge der Fragmente (in bp) des ersten Allels in einer Farbe der Allelleiter mit dem entsprechenden Wert in den Kategorien. Dann vergleichen Sie diese mit den anderen Allelen.
- d) Es werden keine Punktallele gefunden
- Punktallele sind Allele mit mindestens 1 bp Unterschied zu dem nächsten ganzzahligen Allel. Überprüfen Sie die Einstellungen des Analyseverfahrens. Senken Sie den Wert der „Peak Window Size“ auf 11 Punkte.

## Literatur

QIAGEN führt eine umfangreiche und aktuelle Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen die Anwendung von QIAGEN Produkten beschrieben wird. Umfassende Suchoptionen ermöglichen Ihnen das Auffinden der für Sie interessanten Artikel durch eine einfache Stichwortsuche oder durch Eingabe von Anwendung, Forschungsgebiet, Titel usw.

Zugang zur vollständigen Literaturliste haben Sie online über die QIAGEN Reference Database unter [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp). Alternativ können Sie sich an den Technischen Service bei QIAGEN oder an Ihren örtlichen Vertriebshändler wenden.

### Zitierte Literatur

Bär, 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.

Hill, C.R., Kline, M.C., Coble, M.D. und Butler, J.M. (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.*, **53**, 73.

Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37.

## Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Katalog-Nr.
Investigator ESSplex SE Plus Kit (100)	Primermischung, Fast Reaction Mix einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter ESSplex SE Plus, DNA-Längenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381545
Investigator ESSplex SE Plus Kit (400)	Primermischung, Fast Reaction Mix einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter ESSplex SE Plus, DNA-Längenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381547
<b>Verwandte Produkte</b>		
<b>Investigator Human Identification PCR Kits</b>		
Investigator ESSplex Plus Kit (100)*	Primermischung, Fast Reaction Mix einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter ESSplex Plus, DNA-Längenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381535
Investigator Nonaplex ESS Kit (100)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	381315
Investigator IDplex Kit (100)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	381615
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Primermischung, Fast Reaction Mix einschließlich HotStarTaq <i>Plus</i> DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter IDplex Plus, DNA-Längenstandard 550 (BTO) und nukleasefreies Wasser	381625
Investigator HDplex Kit (25)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	381213
Investigator Triplex AFS QS Kit (100)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	380315



<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Investigator Triplex DSF Kit (100)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	380325
Investigator Argus X12 Kit (25)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	383213
Investigator Argus Y12 QS Kit (100)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	383615
Investigator DIPlex Kit (25)*	Primermischung, Reaktionsmischung, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA-Längenstandard und nukleasefreies Wasser	384013
<b>Investigator Quantification Kits</b>		
Investigator Quantiplex Kit (200)	Primermischung IC FQ, Reaktionsmischung FQ, Kontroll-DNA Z1, Verdünnungspuffer	387016
Investigator Quantiplex HYres Kit	Primermischung IC YQ, Reaktionsmischung FQ, Kontroll-DNA Z1, Verdünnungspuffer	387116
<b>Investigator Human Identification PCR Kit-Zubehör</b>		
Matrix Standard BT5 single cap. (5 x 25)	Matrixstandard 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO	386113
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
<b>Analysesoftware</b>		
Investigator IDproof Software	Softwarepaket auf CD mit Installationsdateien für die Desktop-, Server- und Client-Versionen der IDproof Software	9020775
Investigator IDproof Demo Key	Freie Verwendung der Desktop-Version der IDproof Software für 30 Tage nach der Installation	389001

\* Auch größere Kits verfügbar; fragen Sie bitte nach.

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Investigator IDproof Single Key	Ermöglicht die unbegrenzte Verwendung der Desktop-Version der Software, die auf einer einzelnen Workstation mit einer lokalen Datenbank installiert sein muss	389002
Investigator IDproof Server Key	Ermöglicht das Einrichten eines Servers, der die Datenbank und verschiedene Workstations unterhält, die auf diese Datenbank zugreifen. Muss im Zusammenhang mit dem Clientschlüssel erworben werden	389003
Investigator IDproof Client Key	Muss im Zusammenhang mit dem Serverschlüssel erworben werden	389004
Investigator IDproof Mixture Software	Softwarepaket auf CD mit Installationsdateien für die Desktop-, Server- und Client-Versionen der IDproof Mixture Software	9020777
Investigator IDproof Mixture Demo Key	Freie Verwendung der Desktop-Version der IDproof Mixture Software für 30 Tage nach der Installation	389401
Investigator IDproof Mixture Single Key	Ermöglicht die unbegrenzte Verwendung der Desktop-Version der Software, die auf einer einzelnen Workstation mit einer lokalen Datenbank installiert sein muss	389402
Investigator IDproof Mixture Server Key	Ermöglicht das Einrichten eines Servers, der die Datenbank und verschiedene Workstations unterhält, die auf diese Datenbank zugreifen. Muss im Zusammenhang mit dem Clientschlüssel erworben werden	389403
Investigator IDproof Mixture Client Key	Muss im Zusammenhang mit dem Serverschlüssel erworben werden	389404
Investigator Template Files	Alle Template-Dateien für die Investigator Human Identification PCR Kits zu Verwendung mit der GeneMapper <i>ID</i> , GeneMapper <i>ID-X</i> und Genotyper Software sowie mit der Freeware DIPSorter (CD-ROM)	389900

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
<b>DNA-Extraktion und Aufreinigung</b>		
QIAamp® DNA Investigator Kit (50)	50 QIAamp MinElute Säulen, Proteinase K, Carrier-RNA, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	56504
EZ1® DNA Investigator Kit (48)	Reagenzkartuschen (DNA Investigator), Einweg-Filterspitzen, Einweg-Spitzenhalter, Probenröhrchen (2 ml), Elutionsröhrchen (1,5 ml), Puffer G2, Proteinase K, Carrier-RNA	952034
MinElute PCR Purification Kit (50)*	50 MinElute Spin Säulen, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	28004

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) abrufbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden.

---

\* Auch größere Kits verfügbar; fragen Sie bitte nach.

Notizen

Notizen

Notizen

Marken: QIAGEN®, HotStarTaq®, Investigator®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); 3500™, 6-FAM™, ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avant™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Genotyper®, Hi-Di™, POP-4™ (Applied Biosystems Corporation oder ihre Tochtergesellschaften); Biometra® (Biometra medizinische Analytik GmbH); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); GenBank® (US Department of Health and Human Services). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.

#### **Begrenzte Lizenzvereinbarung für das Investigator ESSplex SE Plus Kit**

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

1. Das Produkt kann ausschließlich gemäß den Protokollen verwendet werden, die mit dem Produkt und diesem Handbuch und zur Verwendung nur mit den Komponenten verwendet werden, die in dem Kit enthalten sind. QIAGEN gewährt im Rahmen Ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in den Protokollen, die mit dem Produkt bereitgestellt werden, in diesem Handbuch und in zusätzlichen, im Internet unter <http://www.qiagen.com/> verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser Zusatzprotokolle wurden von QIAGEN-Nutzern für QIAGEN-Nutzer bereitgestellt. Diese Protokolle sind nicht durch QIAGEN gründlich getestet oder optimiert. Weder garantiert QIAGEN für sie noch garantiert QIAGEN, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten 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 könnten 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, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

© 2012 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

