

Februar 2021

Investigator[®] ESSplex SE QS Handbuch

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

Making improvements in life possible[®]

Inhalt

Inhalt.....	4
Lagerung	5
Verwendungszweck	5
Sicherheitshinweise	6
Qualitätskontrolle.....	6
Einleitung.....	7
Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Reagenzien.....	10
Protokoll: PCR-Amplifikation	12
Protokoll: Elektrophorese mit dem ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer	15
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung.....	15
Probenvorbereitung	19
Einrichten der GeneScanSoftware	20
Analyseparameter	23
Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer	24
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung.....	24
Probenvorbereitung	29
Einrichten der Data Collection Software	30
Analyseparameter/Analysemethode	34
Protokoll: Elektrophorese mit dem Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer....	35
Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung.....	36
Vorbereiten der Kalibrierungsstandardplatte für 8 Kapillaren (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)	37

Vorbereiten der Kalibrierungsstandardplatte für 24 Kapillaren (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer).....	37
Zusammenstellen der Platte und Laden der Platte in das Gerät	38
Probenvorbereitung	42
Analyseparameter/Analysemethode	48
Protokoll: Analyse	50
Analysesoftware	50
Kontrollen	52
Qualitätssensor	53
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	59
Literatur	62
Anhang: Interpretation der Ergebnisse.....	63
Bestellinformationen	65
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	68

Inhalt

Investigator ESSplex SE QS Kit	(100)	(400)
Katalog-Nr.	381575	381577
Anzahl der 25- μ l-Reaktionen	100	400
Fast Reaction Mix 2.0* (FRM 2.0)	750 μ l	4 x 750 μ l
Primer Mix ESSplex SE QS	250 μ l	4 x 250 μ l
Nuclease-Free Water (Nuklease-freies Wasser)	1,9 ml	4 x 1,9 ml
Control DNA 9948 (0,1 ng/ μ l)	200 μ l	200 μ l
DNA Size Standard 550 (DNA-Größenstandard 550) (BTO)	55 μ l	220 μ l
Allelic Ladder ESSplex SE QS (ESSplex SE QS Allelleiter)	25 μ l	3 x 25 μ l

* Enthält DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Rinderserumalbumin.

Lagerung

Das Investigator ESSplex SE QS Kit wird auf Trockeneis ausgeliefert. Es muss unmittelbar nach dem Empfang bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden. Der Primermix 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 drei Monate bei $2-8$ °C gelagert werden oder erneut eingefroren und in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur für längere Zeiträume bei -30 bis -15 °C gelagert werden.


Verwendungszweck

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist für molekularbiologische Anwendungen in der Gerichtsmedizin, zur Humanidentifizierung und für Vaterschaftstests vorgesehen. Dieses Produkt ist nicht für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Krankheit bestimmt.

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 einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN-Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als praktische und kompakte PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

<p>VORSICHT</p> 	<p>Es dürfen KEINE Bleichlösungen oder sauren Lösungen direkt zum Probenvorbereitungsabfall gegeben werden.</p>
---	---

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge des Investigator ESSplex SE QS Kit nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten. Die Investigator ESSplex SE QS Kits erfüllen die Anforderungen von ISO 18385.

Einleitung

Das Investigator ESSplex SE QS Kit ist für Multiplex-PCR-Anwendungen in der Gerichtsmedizin, zur Humanidentifizierung und für Vaterschaftstests vorgesehen. Die 16 polymorphen STR-Marker, die vom European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) und der European DNA Profiling Group (EDNAP) als neuer Standardsatz von Loci 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.

Der Primermix des Investigator ESSplex SE QS Kit 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 der sogenannten Fast-cycling-PCR-Technologie von QIAGEN, die die Amplifikation in ungefähr 60 Minuten gewährleistet. Durch die verwendete PCR-Chemie liefert es äußerst robuste Ergebnisse in Gegenwart von Inhibitoren. 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 ergeben, dass mit 0,2–2 ng DNA robuste und ausgewogene 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 96-Well-Block aus goldbeschichtetem Silber) und dem Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer validiert.

Tabelle 1 zeigt die STR-Loci mit der zugehörigen chromosomalen Kartierung und den Repeat-Motiven, die den Vorgaben der International Society for Forensic Genetics (ISFG) für den Gebrauch von Mikrosatelliten-Markern (1) entsprechen.

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

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

Locus	GenBank®-Zugangsnummer	Repeat-Motiv des Referenzallels	Chromosomale Kartierung
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 TTTTTCT [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 Materialien und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Für alle Protokolle

- Hi-Di Formamide, 25 ml (Applied Biosystems, Kat.-Nr. 4311320)
- Matrixstandards BT5 für Multikapillar-Instrumente (QIAGEN Kat.-Nr. 386125) wie beispielsweise ABI PRISM® 3100, Applied Biosystems 3130 und 3500 Series Genetic Analyzer
- Eines der folgenden DNA-Analysegeräte: *
 - ABI PRISM 3100-Avant™/3100 Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer
 - Applied Biosystems 3500/3500xl Genetic Analyzer
- Einer der folgenden PCR-Thermocycler: *
 - QIAamplifier® 96
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
 - ProFlex™ 96-well PCR System
 - Biometra™ UNO-Thermoblock
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- Pipetten und Pipettenspitzen
- 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 für Produkte zur Humanidentifizierung

Die 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 Template Files erleichtern die 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 vor Beginn

- 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 Einwegspitzen mit hydrophoben Filtern.

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

Vorbereitende Schritte

- Bevor Sie die Röhren mit den PCR-Komponenten öffnen, zentrifugieren Sie sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden der Röhren 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 einen Master-Mix her.

Stellen Sie den Mix mit einigen Reaktionen Überschuss her, da beim Überführen ein gewisser Reagenzverlust auftreten kann. Schließen Sie auch Positiv- und Negativkontrollreaktionen ein. Mit Ausnahme der Template-DNA (Probe) und des Nuklease-freien Wassers enthält der Master-Mix alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

3. Mischen Sie den Master-Mix gründlich, zentrifugieren Sie kurz und geben Sie das geeignete Volumen in die PCR-Röhrchen oder die Wells einer PCR-Platte.
4. Geben Sie dem Master-Mix Template-DNA und Nuklease-freies Wasser hinzu, um ein endgültiges Reaktionsvolumen 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 PCR-Reaktion anstelle von Template-DNA Nuklease-freies Wasser.

Tabelle 2. Zusammensetzung des Master-Mix

Komponente	Volumen pro Reaktion
FRM 2.0	7,5 µl
Primermix	2,5 µl
Nuklease-freies 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 das GeneAmp PCR System 9700 mit einem Aluminiumblock verwenden, nutzen Sie „Std Mode“ (Standardmodus); wenn Sie einen 96-Well-Probenblock aus Silber oder einen 96-Well-Probenblock aus goldbeschichtetem Silber verwenden, nutzen Sie „Max Mode“ (Max. Modus). Verwenden Sie nicht „9600 Emulation Mode“ (9600 Emulationsmodus).

Tabelle 3a. Standard-Zyklusprotokoll

Komponente	Dauer	Anzahl der Zyklen
98 °C*	30 s	
64 °C	55 s	3 Zyklen
72 °C	5 s	
96 °C	10 s	
61 °C	55 s	27 Zyklen
72 °C	5 s	
68 °C	5 min	—
60 °C	5 min	—
10 °C	∞	—

* Hot Start zur Aktivierung der DNA-Polymerase.

Tabelle 3b. Optionales Zyklusprotokoll

Komponente	Dauer	Anzahl der Zyklen
98 °C*	30 s	
64 °C	55 s	3 Zyklen
72 °C	5 s	
96 °C	10 s	
61 °C	55 s	27 Zyklen
72 °C	5 s	
68 °C	2 min	—
60 °C	2 min	—
10 °C	∞	—

* Hot Start zur Aktivierung der DNA-Polymerase.

In Tabelle 3b sind die vormalig veröffentlichten Zyklusbedingungen aufgeführt. Diese können weiterhin verwendet werden, sofern im Elektropherogramm keine unvollständige Adenylierung erkennbar ist.

8. Lagern Sie die Proben nach Abschluss des Zyklusprotokolls lichtgeschützt bei -30 bis -15 °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 eine kombinierte Applikation 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	10x 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 Kalibrierungslaufs 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-Formamide	60 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, zum Beispiel Positionen A1–D1.
3. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
4. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.

Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler 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-Formamide	204 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, zum Beispiel Positionen A1–H1 und A2–H2.
3. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
4. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler auf 4 °C einstellen.

Durchführen eines spektralen Kalibrierungslaufs

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. Um die Einstellungen in der Parameterdatei zu ändern, navigieren 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 die „Sensitivity“ (Sensitivität) auf 0.1 und die „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, zum Beispiel „MtxStd{Genescan_SetG5_BT5}.par“.

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

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 „Plate View“ (Plattenansicht) auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Plate Editor“ (Platteneditor) zu öffnen.
4. Geben Sie einen Namen für die Platte ein.
5. Wählen Sie eine spektrale Kalibrierung aus.
6. Wählen Sie „96-Well“ als Plattentyp aus und klicken Sie auf „Finish“ (Fertigstellen).

Tabelle 7. Platteneditor für die spektrale Kalibrierung

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

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.
9. 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 im *ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer User's Manual* (*ABI PRISM 3100-Avant/3100 Genetic Analyzer Benutzerhandbuch*) nach.
10. Klicken Sie auf „OK“, um das Ende des Laufs zu bestätigen.

Überprüfen der Matrix

1. 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.
2. Der Qualitätswert (Q-Wert) muss größer sein als 0,95, und die Konditionszahl (C-Wert) muss zwischen 1 und 20 liegen. Beide Werte müssen im zulässigen Bereich liegen.
3. Überprüfen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Bei jeder Matrixprobe sollten 5 Peaks mit einer Höhe von 1000–5000 RFU auftreten.
Hinweis: Der optimale Bereich beträgt 2000–4000 RFU.
4. Überprüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Es sollten keine Pull-up-Peaks zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R und O) mit der neuen Matrix auftreten.
5. Bei erfolgloser Kalibrierung befolgen Sie die Anweisungen im Abschnitt „Spektralparameter“ auf Seite 17.
6. 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).
7. Benennen Sie die Kalibrierdatei unter „Set Matrix Name“ (Matrixname einstellen) um (z. B. BT5_Datum der Kalibrierung).

Probenvorbereitung

1. Stellen Sie gemäß Tabelle 8 ein Gemisch aus Formamid und DNA-Größenstandard her.

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

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamide	12 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	0,5 µl

2. Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12 µl des Gemisches in ein Röhrchen.
3. Setzen Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.
4. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
5. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.

Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler 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 Multikapillar-Instruments 4 oder 16 Proben pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di Formamide gefüllt werden.

Um auf Multikapillar-Instrumenten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, müssen mehrere Leitern analysiert werden.

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

Einrichten der GeneScanSoftware

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“ (Injektionszeit) 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 (Vorlaufspannung) (kV)	Standard
Pre-Run Time (Vorlaufzeit) (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 „Plate View“ (Plattenansicht) auf „New“ (Neu), um das Dialogfeld „Plate Editor“ (Platteneditor) zu öffnen.
4. Geben Sie einen Namen für die Platte ein.
5. Wählen Sie „GeneScan“ als Anwendungstyp aus.
6. Wählen Sie „96-Well“ als Plattentyp aus und klicken Sie auf „Finish“ (Fertigstellen).

Tabelle 10. Einstellungen im Platteneditor

Parameter	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	Namen für die Matrixproben eingeben
Dyes (Farbstoffe)	<input type="radio"/>
Color Info (Farbinfo)	Leiter oder Probe
Project Name (Projektname)	z. B. 3100_Project1
Dye Set (Farbstoffsatz)	G5
Run Module (Laufmodul)	2.5kV_30s_500bp*
Analysis Module 1 (Analysemodul 1)	DefaultAnalysis.gsp

* Siehe Tabelle 9.

7. Füllen Sie die Tabelle im Platteneditor 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. Zeigen Sie nach Abschluss des Laufs die Daten unter „Color Data“ (Farbdaten) in der Array-Ansicht der 3100 Data Collection Software oder unter „Analyzed Sample Files“ (Analysierte Proben Dateien) unter „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 Stop (Analysebereich Stopp): 10,000	Start: 2000
Data Processing (Datenverarbeitung)	Baseline (Basislinie): Markiert Multicomponent (Mehrkomponenten): Markiert Smooth options (Glättungsoptionen): Light (Leicht)
Peak Detection (Peakerkennung)	Peak Amplitude Thresholds (Peakamplitudengrenzen) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. Peak-Halbwertsbreite): 2 pts (2 Punkte) Polynomial Degree (Grad des Polynoms): 3 Peak Window Size (Größe Peakfenster): 11 pts (11 Punkte)†
Size Call Range (Bereich Größenbestimmung)	Min: 60 Max: 550
Size Call Method (Methode Größenbestimmung)	Local Southern Method
Split Peak Correction (Korrektur gesplitteter Peak)	Keine

* Die Peakamplitudengrenze (Cut-off-Wert) entspricht der Mindest-Peakhöhe, 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 Peakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Hintergrundrauschens 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	10x Puffer mit EDTA für den Genetic Analyzer

Spektrale Kalibrierung/Matrixherstellung

Vor der DNA-Fragmentlängenanalyse muss für jedes Analysegerät eine Spektralkalibrierung 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 Kalibrierungslauf 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-Formamide	60 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	5 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, zum Beispiel Positionen A1–D1.
3. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
4. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
5. Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler auf 4 °C einstellen.

Beispiel für 16 Kapillaren (Applied Biosystems 3130xl 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-Formamide	204 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	17 µl

2. Laden Sie 12 µl des Gemisches auf die 96-Well-Platte, zum Beispiel Positionen A1–H1 und A2–H2.
3. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
4. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler auf 4 °C einstellen.

Durchführen des spektralen Kalibrierungslaufs

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)	Standard (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 zur Spektralkalibrierung (I)

Dialogfeld „New Plate“ (Neue Platte)	Einstellungen
Name	z. B. Spectral_BT5_Datum
Application (Anwendung)	Spectral Calibration (Spektrale Kalibrierung)
Plate Type (Plattentyp)	96-well
Owner Name/Operator Name (Name Besitzer/Name Bediener)	–

Tabelle 17. Platteneditor zur Spektralkalibrierung (II)

Dialogfeld „New Plate“ (Neue Platte)	Einstellungen
Sample Name (Probenname)	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.

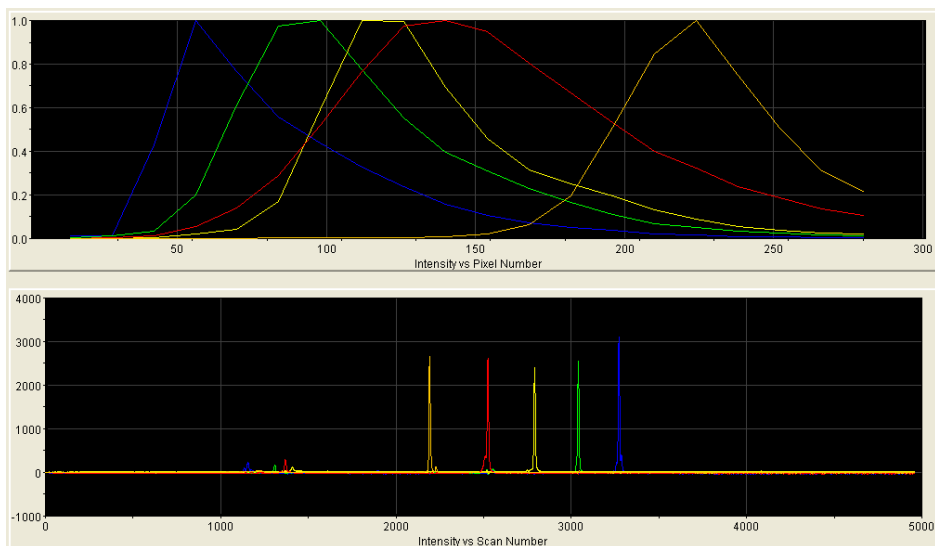


Abbildung 1. Elektropherogramm der spektralen Kalibrierung mit Matrixstandard BT5 auf einem Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

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 Abbildung 1 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.
3. Überprüfen Sie die neue Matrix mit den aktuellen Proben. Es sollten keine Pull-up-Peaks zwischen den Farbstoffpanels (B, G, Y, R und O) mit der neuen Matrix auftreten.
4. Wenn die Kalibrierung nicht bestanden wird, verwenden Sie die optimierten Werte von Matrixstandard BT5 und wiederholen den Kalibrierungslauf.

5. 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. Platteneditor zur Spektralkalibrierung (II)

Komponente	Volumen
Hi-Di-Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

2. Aliquotieren Sie für jede zu analysierende Probe 12 µl der Mischung in ein Röhrchen.
3. Setzen Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.
4. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
5. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.

Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler 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 Multikapillar-Instruments 4 oder 16 Proben pipettiert werden. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di Formamide gefüllt werden.

Um auf Multikapillar-Instrumenten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, müssen mehrere Leitern analysiert werden.

Die Raumtemperatur hat bei Multikapillar-Instrumenten einen Einfluss auf die PCR-Produkte, sodass 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“ (Laufmoduleditor) zu öffnen.

Hinweis: Ändern Sie die Einstellungen für „Run Module Default“ (Laufmodulstandard) von „HIDFragmentAnalysis36_POP4_1“ auf die in Tabelle 19 aufgeführten Werte.

2. Ändern Sie „Injection Voltage“ (Injektionsspannung) auf 2.5 kV, „Injection Time“ (Injektionszeit) 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 einen Namen für das neue Laufmodul ein (z. B. 2.5kV_30s_500bp) und bestätigen Sie, indem Sie auf „OK“ klicken.
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 (Füllvolumen Polymer)	Standard
Current Stability (Stromstabilität) (µA)	Standard
Pre-Run Voltage (Vorlaufspannung) (kV)	Standard
Pre-Run Time (Vorlaufzeit) (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 Probenotyp 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“ (Protokollreditor) zu öffnen. Geben Sie dann die in Tabelle 20 aufgeführten Werte ein.
4. Klicken Sie auf „OK“, um den Protokollreditor zu schließen.

Tabelle 20. Einstellungen im Geräteprotokoll

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

* Siehe Tabelle 19.

Erstellen einer Plattendefinition

Vor jedem Lauf muss eine Plattendefinition erstellt werden.

1. 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)

Protokolleeditor	Einstellungen
Name	z. B. Plate_BT5_Date
Application (Anwendung)	GeneMapper-Anwendung auswählen
Plate Type (Plattentyp)	96-Well
Owner Name/Operator Name (Name Besitzer/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“.

- 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
Snps Set (Snp-Satz)	–
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)

- Starten Sie den Lauf.
- Überprüfen Sie während des Laufs den „Error Status“ (Fehlerstatus) im „Event Log“ (Ereignisprotokoll) oder überprüfen Sie die Qualität der Rohdaten für jede Kapillare im „Capillaries Viewer“ (Kapillar-Viewer) oder „Cap/Array Viewer“ (Kapillar-Array-Viewer).
- Zeigen Sie die Daten als eine Übersicht in der „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 3130/3130xI Genetic Analyzer

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

* Die Peakamplitudengrenze (Cut-off-Wert) entspricht der Mindest-peakhöhe, 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 Peakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Hintergrundrauschens 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 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 jedes Analysegerät eine spektrale Kalibrierung mit den 5 Fluoreszenzmarkern 6-FAM, BTG, BTY, BTR und BTO durch (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 Kalibrierungsstandardplatte
- Zusammenstellen der Platte und Laden der Platte in das Gerät
- Einrichten der Software für Farbstoffsatz BT5
- Durchführen eines spektralen Kalibrierungslaufs
- 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 Kalibrierungsstandardplatte 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-Formamide	90 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	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 min bei 95 °C.
6. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler auf 4 °C einstellen.

Vorbereiten der Kalibrierungsstandardplatte 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-Formamide	225 µl
Matrix Standard BT5 multi cap.	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 min bei 95 °C.
6. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler 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, zum Beispiel 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.

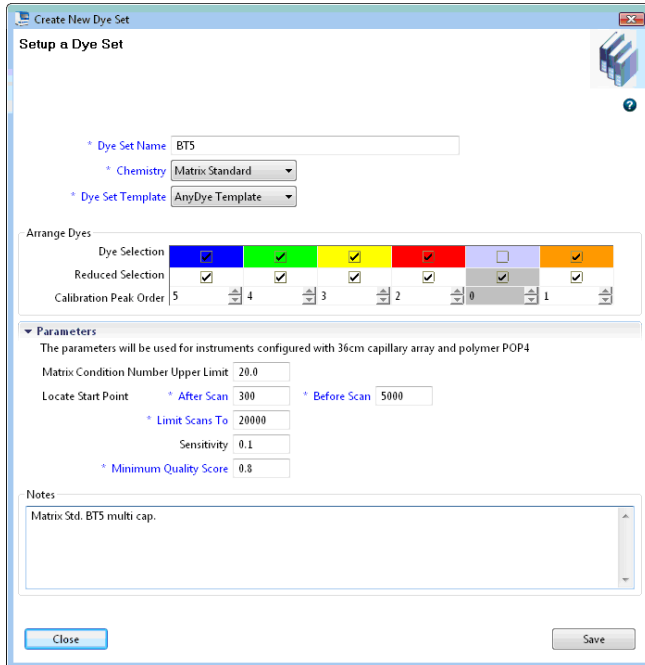


Abbildung 2. Einrichten des Farbstoffsatzes BT5.

Durchführen eines spektralen Kalibrierungslaufs

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“ (Kalibrierungslauf) 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 größer sein als 0,8, und die Konditionszahl (C-Wert) muss im Bereich zwischen 1 und 20 liegen.
- Untersuchen Sie die Matrixproben auf eine flache Basislinie. Wie in 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).

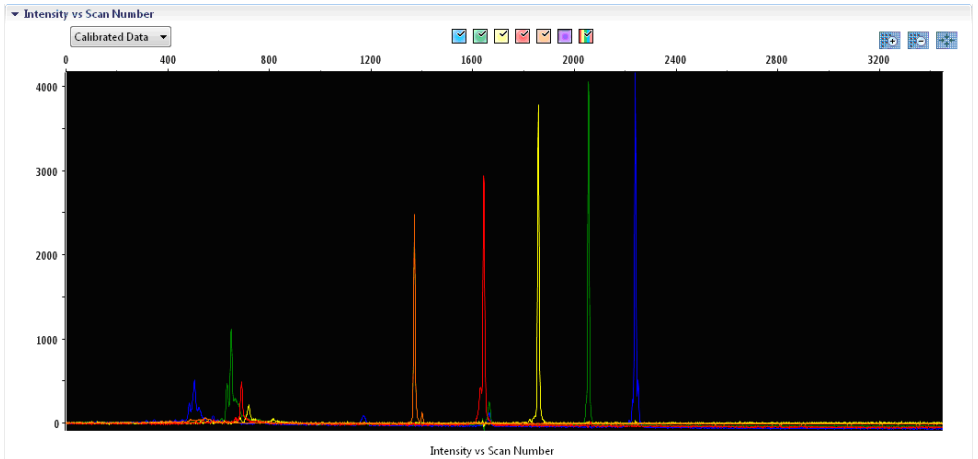


Abbildung 3. Elektropherogramm der spektralen Kalibrierung mit Matrixstandard BT5 auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Nach dem erfolgreichen Abschluss einer spektralen Kalibrierung werden in der Zeile „Overall“ (Gesamt) die Ergebnisse in Grün angezeigt. Wenn in der Zeile „Overall“ (Gesamt) Ergebnisse in Rot angezeigt werden, schauen Sie 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) 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	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Run 3	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
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 Profil der Rohdaten darf keine fremden Peaks aufweisen.
- Die Peakmorphologie des Spektralprofils darf keine größeren Überlappungen, Absenkungen oder andere 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). Schauen Sie in diesem Fall 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) nach.

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 der Mischung in ein Röhrchen.
5. Setzen Sie 1 µl PCR-Produkt oder Allelleiter (nötigenfalls verdünnt) hinzu.
6. Denaturieren Sie 3 min bei 95 °C.
7. Kühlen Sie die Platte schnell herunter, indem Sie sie für 3 min auf Eis setzen.
Alternativ können Sie zum Kühlen der Platte auch den Thermocycler 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-Formamide	12,0 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,5 µl

Hinweis: Da die Injektionen in allen Kapillaren gleichzeitig durchgeführt werden, muss/müssen mindestens 1 vollständige Spalte (8-Proben-Protokoll) bzw. 3 vollständige Spalten (24-Proben-Protokoll) der Platte eines Multikapillar-Instruments pipettiert sein. Wenn weniger Proben analysiert werden, müssen die leeren Positionen mit 12 µl Hi-Di Formamide gefüllt werden.

Um auf Multikapillar-Instrumenten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, injizieren Sie für jeweils 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 Multikapillar-Instrumenten einen Einfluss auf die PCR-Produkte, sodass 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.

Einen Lauf einrichten

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
- QK-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 Einstellungen für „Run Module Default“ (Laufmodulstandard) 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
PreRun Voltage (Vorlaufspannung) (kV)	Standard (15)
Injection Voltage (Injektionsspannung) (kV)	1.2
Run Time (Laufzeit) (s)	1550
PreRun 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
PreRun Voltage (Vorlaufspannung) (kV)	Standard (15)
Injection Voltage (Injektionsspannung) (kV)	1.6
Run Time (Laufzeit) (s)	1550
PreRun 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 Size Standard 550 (BTO) mit den folgenden Fragmentlängen 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 sollte verwendet werden.

3. Sie können mit Hilfe der empfohlenen Investigator Template File „SST-BTO_60-500bp“ alternativ auch die Parameter des DNA Size Standard 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

QK-Protokoll

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

Tabelle 32. Parameter des QK-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“ (Analyseeinstellungen) „Peak Amplitude Threshold“ (Peakamplitudengrenze) aus und deaktivieren Sie „Purple“ (Lila). Stellen Sie sicher, dass alle anderen Farben aktiviert sind.

Berücksichtigen Sie die empfohlenen Analyseeinstellungen in Tabelle 35 auf Seite 49. Für alle anderen Einstellungen ist die Standardeinstellung „Default“ (Standard) 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 Kit 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 (Assay-Name)	z. B. Investigator ESSplex SE QS
Color (Farbe)	Standard
Application Type (Anwendungstyp)	HID
Instrument Protocol (Geräteprotokoll)	z. B. Investigator ESSplex SE QS
QC Protocol (QK-Protokoll)	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 einer Probe oder Allelleiter einen festgelegten Probenamen ein. Dadurch kann für die Datenerfassung und -verarbeitung die Well-Position jeder Probe zugeordnet werden.
5. Wählen Sie unter „Assay“ das gewünschte Assay für die Analyse aus. Wenn Sie die unter „Einen Lauf einrichten“ beschriebenen Schritte ausgeführt haben, klicken Sie auf „Add from Library“ (Aus 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 reinitialisieren. 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 36 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 (Peakerkennungsalgorithmus)	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 Baselining (Glättung und Basislinie)	Smoothing (Glättung): Light (Leicht) Baseline Window (Basislinienfenster): 51 pts (51 Punkte)
Size Call Method (Methode Größenbestimmung)	Local Southern Method
Peak Detection (Peakerkennung)	Peak Amplitude Thresholds (Peakamplitudengrenzen) B:* Y:* G:* R:* O:* Min. Peak Half Width (Min. Peak-Halbwertsbreite): 2 pts (2 Punkte) Polynomial Degree (Grad des Polynoms): 3 Peak Window Size (Größe Peakfenster): 11 pts (11 Punkte) [†] Slope Thresholds (Grenzen Steigung): 0.0

* Die Peakamplitudengrenze (Cut-off-Wert) entspricht der Mindest-peakhöhe, 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 Peakhöhe sollte mindestens dem Dreifachen des Hintergrundrauschens 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 Fähigkeit zur Lokalisierung der genauen Längen der amplifizierten Produkte hängt 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 Size Standard 550 (BTO) mit den folgenden Fragmentlängen 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 sollte verwendet werden (Abbildung 5).

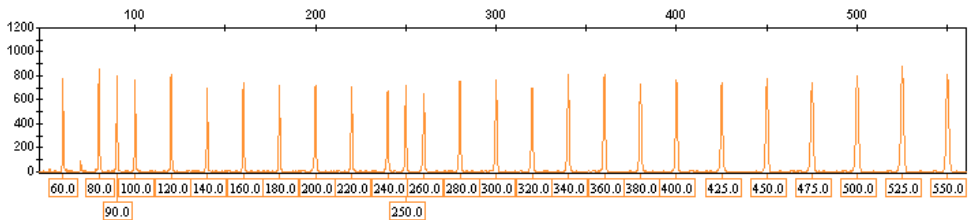


Abbildung 5. Elektropherogramm des DNA Size Standard 550 (BTO), Fragmentlängen in bp.

Analysesoftware

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

Tabelle 36. Empfohlene Investigator Template Files für GeneMapper ID

Parameter	Einstellungen
Panels	ESSplex_SE_QS_Panels
BinSets	ESSplex_SE_QS_Bins
Size standard (Größenstandard)	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Analysemethode)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu
Plot Settings (Diagrammeinstellungen)	Plots_5dyes

Panels und BinSets müssen immer verwendet werden; die Verwendung anderer Parameter ist optional.

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

Parameter	Einstellungen
Panels	ESSplex_SE_QS_Panels_x
BinSets	ESSplex_SE_QS_Bins_x
Stutter	ESSplex_SE_QS_Stutter_x
Size standard (Größenstandard)	SST-BTO_60–500bp
Analysis Method (Analysemethode)	Analysis_HID_3130_50rfu Analysis_HID_3130_200rfu Analysis_HID_3500_50rfu Analysis_HID_3500_200rfu
Plot Settings (Diagrammeinstellungen)	Plots_5dyes

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 (CCRs) erworben wurde, sowie eine weitere Referenz-DNA von CCR gemäß dem Standard von Szibor et al. (3).

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 Primermix 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 unspezifischen Bindung während der Multiplex-PCR-Amplifikationsreaktion ist daher sehr gering.

Eine erfolgreiche Amplifikation des kleinen Qualitätssensors (QS 1) zeigt im Allgemeinen an, dass die PCR korrekt zusammenpipettiert 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 oder bei der PCR-Durchführung selbst Fehler begangen wurden. Die Analyse kann in diesem Fall wiederholt werden, wobei der Anwender bei der Vorbereitung mit größerer Sorgfalt vorgehen sollte, 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 Primermixe mit oder ohne Qualitätssensoren vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Die Analyse der beiden internen Kontrollfragmente QS1 und QS2 sowie der Amplifikationsprodukte der STR-Zielsequenzen ermöglichen es, auf differenzielle Weise festzustellen, ob in der PCR Inhibitoren vorliegen oder DNA-Degradation stattgefunden haben.

Bei der Probedegradation ist die Amplifikation kleinerer Zielfragmente effizienter als die größerer, behindert jedoch nicht die Amplifikation der internen Kontroll-Template (Abbildung 6). Ein ausgeglichenes Verhältnis von QS1 zu QS2 in Verbindung mit einem Verhältnis zugunsten kleiner STR-Produkte weist daher auf eine Degradation der Probe hin.

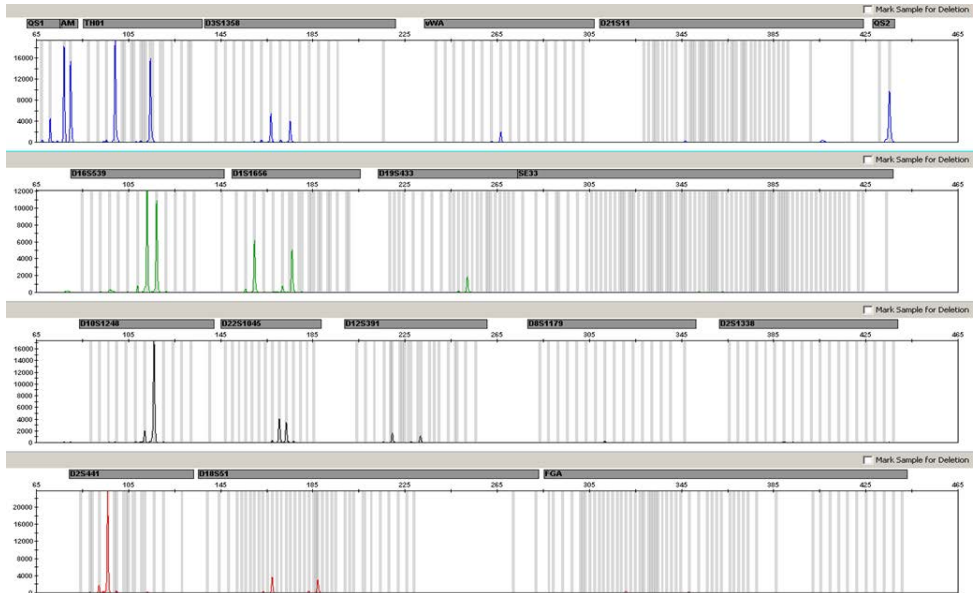


Abbildung 6. Elektropherogramm der STR-Analyse in Gegenwart degradiertes DNA (Fragmente von 150 bp). Die genomische DNA wurde mittels Ultraschall in 150-bp-Fragmente geschnitten. Große STR-Fragmente wurden mit einer sehr geringen Ausbeute amplifiziert, QS1 und QS2 wurden jedoch mit normalen Peakhöhen 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 größere DNA-Fragmente werden weniger amplifiziert als kleinere. 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 kleinen Qualitätssensors (QS1) weist somit auf die Gegenwart von Inhibitoren hin (Abbildung 7).

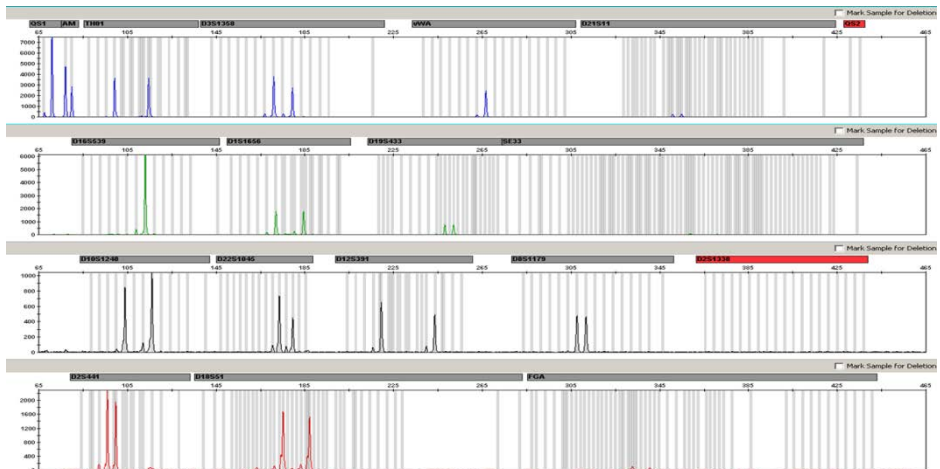


Abbildung 7. Elektropherogramm der STR-Analyse in Gegenwart von Hämatin. Es wurden sechzehn STR-Marker, Amelogenin und die beiden Qualitätssensoren in Gegenwart von 1000 μM Hämatin amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die Amplifikation der hochmolekularen Fragmente, einschließlich 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 Auswertung der beiden Qualitätssensoren ermöglicht es, auf differenzierte Weise festzustellen, ob PCR-Inhibitoren vorliegen oder ob in der forensischen Probe DNA-Degradationsprozesse 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	DNA-Degradation

Hinweis: Die Peakhöhen von QS1 und QS2 können sich von Analyse zu Analyse geringfügig unterscheiden. Eine geringe Streuung der Peakhöhen 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 Peakhöhen festzulegen.

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

Allele

Die Allele der Allelleiter sind in Tabelle 40 zusammengefasst. Alle Analysen wurden mit dem Polymer POP-4 durchgeführt (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	Allele 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

Hinweis: Die Allele sind zur besseren Orientierung in der Alleleiter erhöht.

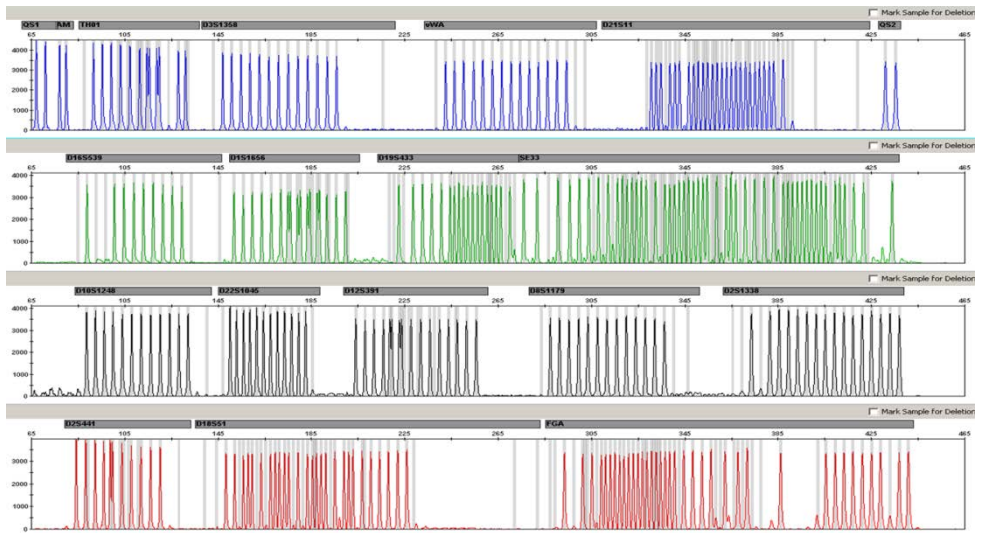


Abbildung 8. Elektropherogramm der Alleleiter ESSplex SE QS, die auf einem Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer analysiert wurde. Die Alleleiter enthält zwei Allele für jeden Qualitätssensor (QS1 und QS2). Dies ermöglicht eine automatische Bestimmung der QS-Peaks im Rahmen der Probenanalyse.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ (Frequently Asked Questions, FAQ) unseres TechniksUPPORT-Zentrums unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim Technischen Service von QIAGEN unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen oder Protokollen in diesem Handbuch haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter support.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Unausgeglichene Profile, Signale geringer Intensität

- | | |
|--|---|
| a) Falsches Volumen des FRM oder Primermixes | Zusammensetzung des PCR-Mixes 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 der Qualitätssensoren ist normal und nicht auf den Einfluss von Inhibitoren zurückzuführen.

Die Variationsbreite ist bei der Validierung im Kontext der jeweiligen Probentypen 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 Inhibition der PCR-Reaktion an.

Probenvorbereitung

Die Signalintensität der Probe muss erhöht werden.

Reduzieren des Volumens des DNA Size Standard 550 (BTO) auf Peakhöhen von ungefähr 500 RFU.

Aufreinigen der PCR-Produkte vor Beginn der Analyse. Für eine schnelle und effektive Aufreinigung empfehlen wir das MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN, Kat.-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. Wiederholen der Matrixherstellung bzw. spektrale Kalibrierung. Darauf achten, dass das richtige Protokoll für das jeweilige Analysegerät verwendet wird.

Kommentare und Vorschläge

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

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Der DNA Size Standard 550 (BTO) wurde nicht richtig definiert oder identifiziert. | In der oberen Symbolleiste der GeneMapper <i>ID</i> oder GeneMapper <i>ID-X</i> 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 Size Standard 550 verwenden. |
| b) | Die Signalintensitäten sind zu hoch. Wenn die Peakhöhen der Proben außerhalb des linearen Nachweisbereichs (> 5000 RFU/> 20.000 RFU)* liegen, kann die Anzahl von Stutterpeaks, Splitpeaks 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 Fehlzurordnung der Allele führen. | Zur Bestätigung der Ergebnisse die Elektrophorese wiederholen. Sicherstellen, dass die maximale vom Gerätehersteller empfohlene Anzahl an Injektionen nicht überschritten wurde. Bei Bedarf ein neues Kapillar-Array einrichten. |
| d) | Unterschiede in der Laufleistung der Kapillaren eines Multikapillar-Instruments können zu Verschiebungen bei der Allelzuordnung führen. | Um auf Multikapillar-Instrumenten 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 OL-Peaks 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 (ca. 30 Minuten lang) vorzuwärmen. |

Inkorrekte Injektion/Datei der Allelleiter

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Fehlfunktionen während der Elektrophorese können dazu führen, dass ein zusätzliches Signal als Peak der Allelleiter identifiziert wird. Wenn die Peaks der Allelleiter nicht korrekt bestimmt werden, darf die Leiter für die Analyse nicht verwendet werden. | Eine andere Injektion/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 Size Standard 550 verwenden. |
|----|---|--|

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| b) Ein Peak der Allelleiter liegt unterhalb des Peak-Nachweisbereichs (50–200 RFU) der verwendeten Analysemethode 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 mindestens 1 bp Unterschied zu dem nächsten ganzzahligen Allel. Die Einstellungen der Analysemethode überprüfen. Den Wert für „Peak Window Size“ (Größe Peakfenster) auf 11 Punkte senken. |
| e) Unterschiede in der Laufleistung der Kapillaren eines Multikapillar-Instruments können zu Verschiebungen bei der Allelzuordnung führen. | Um auf Multikapillar-Instrumenten eine zuverlässige Allelzuordnung zu gewährleisten, sollten mehrere Allelleitern analysiert werden. |
- * > 5000 RFU für den 3100 und 3130 Genetic Analyzer; > 20.000 RFU für den Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Literatur

1. Bär, W., et al. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. *Int. J. Legal Med.* 110, 175–176.
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, 73–80.
3. Szibor, R., et al. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics – the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* 138, 37–43.

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 „Hilfe zur Fehlerbehebung“ auf Seite 59) oder wenn eine inkorrekte Matrix angewendet wurde. Sie treten an den Positionen spezifischer Peaks von anderen Farbkanälen 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 ist abhängig von der Sequenz der Repeat-Struktur und der Anzahl der Allele. $n-4$ Peaks werden durch den Verlust einer Repeat-Einheit während der Amplifikation des Tetranukleotid-STR-Motivs verursacht. Dieser Verlust ist wiederum auf Rutsch-Effekte der *Taq*-DNA-Polymerase zurückzuführen. $n-3$ Peaks hingegen treten 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 erwartet (-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 korreliert mit der DNA-Menge. Jedes Labor sollte eigene Grenzwerte für die Analyse von Peaks festlegen.

Artefakte

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

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator ESSplex SE QS Kit (100)	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	381575
Investigator ESSplex SE QS Kit (400)	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	381577
Verwandte Produkte		
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)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	382415
Investigator 24plex GO! Kit (200)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter und DNA Size Standard 24plex (BTO)	382426

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator 26plex QS Kit (100)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 3.0, Kontroll-DNA, Allelleiter und Nuklease-freies Wasser	382615
Investigator IDplex Plus Kit (100)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM), Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	381625
Investigator IDplex GO! Kit (200)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM), Kontroll-DNA, Allelleiter und DNA Size Standard 550 (BTO)	381636
Investigator HDplex Kit (100)	Primermix, Reaktionsgemisch, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	381215
Investigator Triplex AFS QS Kit (400)	Primermix, Reaktionsgemisch, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (ROX) und Nuklease-freies Wasser	380317
Investigator Argus X-12 QS Kit (25)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 2.0, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	383223
Investigator Argus Y-28 QS Kit (100)*	Primermix, Fast Reaction Mix (FRM) 3.0, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	383625

* Größere Kits sind auf Anfrage erhältlich.

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Investigator DIPplex Kit (100)	Primermix, Reaktionsgemisch, DNA-Polymerase, Kontroll-DNA, Allelleiter, DNA Size Standard 550 (BTO) und Nuklease-freies Wasser	384015
Investigator Quantiplex Pro Kit (200)	Zur Verwendung auf Applied Biosystems 7500 Real-Time Systemen: Quantiplex Pro Reaktionsgemisch, Quantiplex Pro Primermix, Quantiplex Pro Kontroll-DNA M1 und QuantiTect® Puffer zur Nukleinsäureverdünnung	387216
Investigator Quantiplex Pro RGQ Kit (200)	Zur Verwendung auf QIAGEN RotorGene Q Real-Time Systemen: Quantiplex Pro RGQ Reaktionsgemisch, Quantiplex Pro RGQ Primermix, männliche Kontroll-DNA M1 und QuantiTect Puffer zur Nukleinsäureverdünnung	387316

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Haftungsausschlüsse finden Sie im Handbuch oder Benutzerhandbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Benutzerhandbücher zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

* Größere Pakungseinheiten sind erhältlich.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Datum	Änderungen
06/2015	Erste Überarbeitung
12/2020	Optionale finale Elongation hinzugefügt. Hinweis hinzugefügt, dass die Investigator ESS SE QS Kits die Anforderungen von ISO 18385 erfüllen. Abschnitte „Bestellinformationen“ aktualisiert.
02/2021	Tabelle 3 in Tabelle 3a und 3b unterteilt. Abschnitt „Bestellinformationen“ aktualisiert. Im Abschnitt „Vom Anwender bereitzustellende Materialien und Reagenzien“ „Veriti™ 96-Well Thermal Cycler“ und „ProFlex™ 96-well PCR System“ hinzugefügt.

Hinweise

Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für das Investigator ESSplex SE QS Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer 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 ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, Kit-Komponenten zusammen mit anderen Komponenten (die nicht zu diesem Kit gehören) zu verwenden, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen oder in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Benutzern für andere QIAGEN-Benutzer 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 durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Benutzer 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, zurückfordern, 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 finden Sie unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamplifier®, HotStarTaq®, Investigator®, Making improvements in life possible®, MinElute®, QuantiTect®, (QIAGEN Group); Biometra™ (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, Avant™, FAM™, GeneAmp®, GeneMapper®, GeneScan®, Hi-Di™, POP-4®, ProFlex™, Veriti™ (Thermo Fisher Scientific oder Tochtergesellschaften); GenBank® (US Department of Health and Human Services). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

02/2021 HB-1963-003 © 2021 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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