

Mentype[®] DigitalScreen

Handbuch

RUO

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für
medizinische Diagnostik

DGSHB01v3de

11.04.2025

REF

45-46410-0004

LOT

Chargennummer



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Website: www.biotype.de

Email: support@biotype.de

Bestellung: sales@biotype.de

Änderungshinweis

Bitte beachten Sie die folgenden Anpassungen gegenüber der vorherigen Handbuch-Version:

Dokumentnummer	Änderungen	Datum
DGSHB01v1de	Initiale Version	09.03.2023
DGSHB01v2de	Anpassung Layout	13.02.2025
DGSHB01v3de	Neue Artikelnummer DIP Positive Control	11.04.2025

Für weitere Fragen, kontaktieren Sie uns gerne

unter +49 351 8838 400 oder

support@biotype.de

Inhalt

Produktbeschreibung	4
Zusammenfassung und Erläuterung	4
Mitgelieferte Materialien	5
Reagenzienlagerung und -handhabung	6
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	6
Allgemeine Laborausstattung.....	6
Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial.....	7
Geräte und Software	8
Probenmaterial	8
Warnungen und Sicherheitshinweise	9
Protokoll	9
Übersicht über den experimentellen Ablauf	9
Probenvorbereitung.....	10
Probenahme und DNA Extraktion	10
DNA Lagerung.....	11
Vorbereitung der Kontrollproben	11
Positivkontrolle PC	11
No Template Kontrolle (NTC).....	11
Mastermix Ansatz.....	11
Restriktionsverdau	13
Droplet Digital™ PCR – Tröpfchenerzeugung	13
PCR Amplifikation	15
Auslesen der Droplets	16
Datenanalyse	17
Generelle Bewertung	17
Identifikation informativer Loci.....	18
Charakteristik und Verfügbarkeit der Mentype® DigitalQuant Assays	19
Qualitätskontrolle	21

Technische Unterstützung	21
Referenzen	21
Einschränkungen	22
Bestellinformation	23
Marken und Haftungsausschluss	25
Symbole	26

Produktbeschreibung

Das Testkit Mentype® DigitalScreen ist zur qualitativen Bestimmung der Allelverteilung von Insertions-Deletions-Polymorphismen in ungemischten DNA-Proben bestimmt. Eine Quantifizierung unter Nutzung des Kits Mentype® DigitalScreen ist nicht möglich.

Das Testkit darf nur für Forschungszwecke verwendet werden, eine Nutzung zu diagnostischen Zwecken ist nicht gestattet.

Das Testkit darf nur von professionellen Nutzern angewendet werden, die auf molekular-biologische Techniken im Allgemeinen und die Durchführung der digitalen PCR im Besonderen geschult sind.

Zusammenfassung und Erläuterung

Der Mentype® Digital Ansatz setzt die hochempfindliche digitale PCR-Technologie ein, die eine absolute Quantifizierung der DNA ermöglicht. Spezifisch für die digitale PCR (dPCR) ist die Proben-Partitionierung in eine große Anzahl von Nano-Tröpfchen. Jedes Tröpfchen stellt ein separates Kompartiment dar, welches Nano-Liter der Probe enthält. Während des PCR fungiert jedes Tröpfchen als separate PCR-Reaktionskammer. Je nachdem, wie viele Exemplare der Ziel-DNA-Moleküle in die Tröpfchen aufgeteilt wurden (Null, eine oder mehrere Kopien), wird eine Vielzahl von Replikaten pro einzelnen PCR-Lauf erzeugt. Mit Hilfe der Poisson-Statistik kann die absolute Anzahl der Startkopien sehr genau bestimmt werden. Nach der PCR wird jedes Tröpfchen automatisch analysiert und für einen Ziel-DNA Anteil bestimmt.

Mentype® DigitalScreen repräsentiert eine Screening-Platte zur qualitativen Detektion biallelischer Short Insertions-/Deletions-Polymorphismen (INDELs). Die hierdurch identifizierten Marker können für die anschließende DNA-Quantifizierung mit dem Kit Mentype® DigitalQuant genutzt werden (siehe [Abbildung 1](#)).

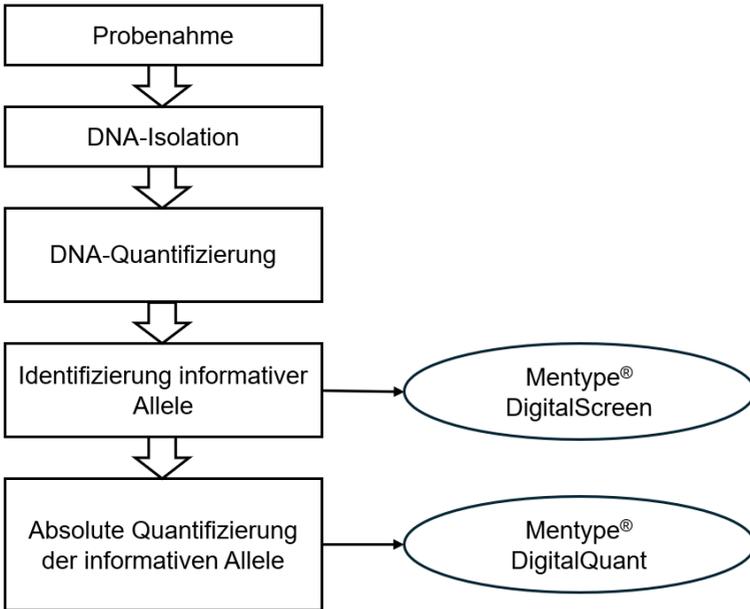


Abbildung 1 Von der Probe bis zum Ergebnis Analyse mit Mentype® DigitalScreen und Mentype® DigitalQuant

Alle spezifischen DIP-Marker (siehe [Tabelle 7](#)) sind mit FAM markiert, die aktive Referenz (REF) ist mit HEX markiert.

Mitgelieferte Materialien

Die folgenden Reagenzien zur Durchführung des Kits Mentype® DigitalScreen sind im Lieferumfang enthalten:

Tabelle 1 Inhalt des Mentype® DigitalScreen Kits

Komponente	Reagenz	Deckel-farbe	Anzahl pro Kit	Lagerung
Nuclease-Free Water	Nuklease-freies Wasser	Hellblau	2 x	-25 °C bis
			1,5 mL	-15 °C
Mentype® DigitalScreen screening plate	Screeningplatte Mentype® DigitalScreen	-	4	2 °C bis 8 °C, vor Licht geschützt

HINWEIS



Das Kit enthält Komponenten zur Testung von 4 DNA-Paaren (8 Proben).

Reagenzienlagerung und -handhabung

Das Kit wird gekühlt versandt.

Bitte überprüfen Sie bei Erhalt des Kits dessen Vollständigkeit. Wenden Sie sich bitte sofort an BIOTYPE GmbH, wenn eine oder mehrere Komponenten oder die Verpackung während des Transports beschädigt wurden.

Lagern Sie die Komponenten entsprechend der Angaben auf der Verpackung und lichtgeschützt.

Das Ablaufdatum des Kits ist auf dem Etikett der Verpackung angegeben.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Allgemeine Laborausstattung

- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 mL Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer
- Kalibrierte, einstellbare Pipetten mit aerosoldichten Filterspitzen
- Geeignete 200 µL 96-Well-Reaktionsplatten (abhängig vom Gerätehersteller) mit geeigneter optischer Folie, PCR-Qualität
- Geeignete Racks für 2 mL-Reaktionsgefäße
- Kühlrack für 2 mL-Reaktionsgefäße
- Puderfreie Einweghandschuhe
- NanoDrop™ Spektrophotometer oder Qubit Fluorometer
- PCR-Arbeitsplatz oder Sterilbank

HINWEIS

Das gesamte für die PCR verwendete Material muss von angemessener Qualität sein (DNA-frei und für die Molekularbiologie geeignet). Bitte stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Geräte gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet wurden.

Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterial**Tabelle 2 Erforderliche aber nicht mitgelieferte Materialien**

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
DIP Positive Control, 20 Reaktionen	BIOTYPE GmbH	27-13201-0100
2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP), 5 x 1 mL	Bio-Rad Laboratories	1863024
FastDigest EcoRI, 800 Reaktionen	ThermoFisher Scientific	FD0274
QIAamp DNA Blood Mini Kit, 50 Reaktionen	Qiagen	51104
NucleoSpin Blood L Kit, 20 Reaktionen	Macherey-Nagel	740954.20

Tabelle 3 spezielle Geräte und Verbrauchsmaterialien für die droplet digital™ PCR

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Bestellnummer
QX200™ Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories	17005227
PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories	17005226
QX200™ Droplet Reader	Bio-Rad Laboratories	17005228
Droplet Generation Oil for Probes, 10 x 7 mL	Bio-Rad Laboratories	1863005
ddPCR™ Droplet Reader Oil, 2 x 1 L	Bio-Rad Laboratories	17005221
DG8™ Cartridge Holder, 1x	Bio-Rad Laboratories	1863051

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Bestellnummer
DG8™ Cartridges for QX200™/QX100™ Droplet Generator, 24 x	Bio-Rad Laboratories	17005222
DG8™ Gaskets for QX200™/QX100™ Droplet Generator, 24 x	Bio-Rad Laboratories	17005223
Pierceable Foil Heat Seals, 100x	Bio-Rad Laboratories	17005225
ddPCR™ 96-Well Plates, semi-skirted, 25x	Bio-Rad Laboratories	17005224
ddPCR™ Buffer Control for Probes, 2x 4,5 mL	Bio-Rad Laboratories	1863052
96-well PCR foil	beliebig	verschiedene

Geräte und Software

Das Testkit Mentype® DigitalScreen wurde mit dem Bio-Rad QX100™ und QX200™ Droplet Digital™ PCR System mit der Quanta™Soft Software (v1.7.4) und den folgenden Thermocyclern entwickelt:

- Applied Biosystem GeneAmp® PCR System 9700 Aluminium und GeneAmp® PCR System 9700 Silber
- Eppendorf Mastercycler ep-S und Mastercycler nexus
- Biometra T1
- Bio-Rad DNA Engine PTC-200

HINWEIS



Die Verwendung des Mentype® DigitalScreen Assays auf anderen Instrumenten liegt in der Verantwortung des Anwenders und muss eigenverantwortlich validiert werden.

Probenmaterial

Die folgenden Proben wurden mit dem Mentype® DigitalScreen Kit verifiziert:

- DNA, die peripheren venösen Blutproben extrahiert wurde
- DNA, die aus Knochenmark extrahiert wurde.

Warnungen und Sicherheitshinweise

- Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.
- Lesen Sie die Sicherheitsdatenblätter (SDS) für alle BIOTYPE Produkte, die unter <https://www.biotype.de/sicherheitsdatenblatter> und auf Anfrage erhältlich sind. Bitte wenden Sie sich an die jeweiligen Hersteller, um Kopien der SDS für zusätzlich benötigte Reagenzien zu erhalten.
- Kitkomponenten verschiedener Kitchargen dürfen nicht gemischt werden.
- Das Aliquotieren der Kitkomponenten in andere Reaktionsgefäße ist nicht erlaubt.
- Dieses Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die speziell in PCR-Techniken unterwiesen und geschult sind.
- Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor dem ersten Gebrauch auf:
 - Unversehrtheit
 - Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Füllung (siehe Kapitel Mitgelieferte Materialien)
 - Korrekte Beschriftung
 - Zustand bei der Ankunft.
- Verwenden Sie kein Kit, dessen Verfallsdatum überschritten ist.
- Entsorgen Sie Proben- und Assayabfälle entsprechend den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Alle verwendeten Geräte wurden gemäß den Anweisungen und Empfehlungen des Herstellers installiert, kalibriert, überprüft und gewartet.

Protokoll

Übersicht über den experimentellen Ablauf

Die Analyse der DNA-Proportionen beginnt mit dem Mentype® DigitalScreen Kit, um die informativen Marker zu bestimmen, welche für die Quantifizierung mit dem Kit Mentype® DigitalQuant eingesetzt werden können.

Die Mentype® DigitalScreen Platte enthält dehydrierte DIP-Locus spezifische Primermischungen sowie die aktive Referenz (REF). Zwei DNA-Proben (z.B. Spender und Empfänger) können gegen ein Set von 30 Assays in einem Durchlauf auf DNA-spezifische Unterscheidungsmerkmale analysiert werden. Das Platten-Layout ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 2).

HINWEIS



Achten Sie darauf, die Platte in der richtigen Ausrichtung zu benutzen (mit den Buchstaben auf der linken Seite).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	67-D	104-D	131-I	301-I	67-D	104-D	131-I	301-I				
B	70-D	104-I	133-I	304-D	70-D	104-I	133-I	304-D				
C	70-I	105-D	134-I	304-I	70-I	105-D	134-I	304-I				
D	88-D	105-I	140-I	307-I	88-D	105-I	140-I	307-I				
E	88-I	106-I	152-D	310-I	88-I	106-I	152-D	310-I				
F	97-I	114-D	163-D	SRY	97-I	114-D	163-D	SRY				
G	101-D	114-I	163-I	PTC	101-D	114-I	163-I	PTC				
H	101-I	128-D	301-D	NTC	101-I	128-D	301-D	NTC				

DNA 1
DNA 2

Abbildung 2 Belegungslayout der Mentype® DigitalScreen Platte

Probenvorbereitung

Probenahme und DNA Extraktion

Dieser Test ist für die Verwendung von DNA, welche aus peripheren Blutproben sowie Knochenmark extrahiert wurde, vorgesehen. Die Nutzung anderer Proben (z. B. sortierte Zellen) muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden.

Zur DNA-Extraktion sollten kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von genomischer DNA genutzt werden. Die folgenden Kits werden zur DNA-Extraktion empfohlen:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
- NucleoSpin Blood L Kit (Macherey-Nagel)

Die DNA sollte direkt nach der Extraktion mit dem NanoDrop Spektrophotometer oder dem Qubit Fluorometer quantifiziert werden. Konzentrierte DNA kann durch Verdünnung mit 1 x TE-Puffer auf die benötigte Konzentration von 2 – 4 ng/μL eingestellt werden.

DNA Lagerung

Lagern Sie die DNA-Proben bei - 25 °C bis - 15 °C. Unverdünnte DNA Proben können 4 Wochen lang bei 2 °C bis 8 °C oder bei -25 °C bis 15 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Kontrollproben

Positivkontrolle PC

Tauen Sie die DIP Positive Control (DPC, separat erhältlich) auf, homogenisieren Sie diese durch vorsichtiges vortexen, gefolgt von kurzem Abzentrifugieren. Setzen Sie die DPC unverdünnt anstelle einer Probe ein.

No Template Kontrolle (NTC)

Verwenden Sie das im Kit enthaltene Nuclease-Free Water als No Template Kontrolle (NTC) anstelle einer Probe.

Mastermix Ansatz

Stellen Sie folgende Komponenten bereit, tauen Sie die Reagenzien bei Bedarf auf und mischen Sie diese kurz. Zentrifugieren Sie die Reagenzien anschließend kurz (ca. 10 s) ab. Lagern Sie das Enzym während der Benutzung auf einem Kühlrack.

- Nuclease-Free Water (blauer Deckel, im Kit enthalten)
- EcoRI Enzym
- 2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)

HINWEIS

Beachten Sie die Haltbarkeit des 2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) nach Anbruch. Dieser sollte nach dem Auftauen für maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert und verwendet werden.

Bereiten Sie den Mastermix Ansatz entsprechen Tabelle 4 vor.

Tabelle 4 PCR Mastermix Ansatz

Komponente	Finale Konzentration	Volumen je Reaktion	
		# 1	# 66 (1 Platte)
2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)	1 x	10,0 µL	660,0 µL
FastDigest EcoRI Enzym		0,5 µL	33,0 µL
Nuclease-Free Water		4,5 µL	297,0 µL
Gesamtvolumen	-	15,0 µL	15,0 µL/Well
DNA-Template (2 - 4 ng/µL) oder Kontrollprobe	10 – 20 ng/Well	5,0 µL	50,0 µL/Well

HINWEIS

Die DNA-Konzentration für jede Probe pro Well sollte 10 – 20 ng in einem maximalen Volumen von 9,5 µL betragen. Für eine gegebene Probe sollten alle Wells die gleiche Menge an DNA enthalten.

Mixen Sie den PCR Mastermix vorsichtig ohne Luftblasen zu erzeugen und zentrifugieren Sie anschließend kurz ab. Legen Sie in jedes Well 15 µL des Mastermixes vor, pipettieren Sie anschließend die Proben hinzu. Verschließen Sie die Platte mit einer PCR Folie und mischen Sie die Platte gründlich (vortexen), so dass sich die getrocknet vorliegenden Primer vollständig lösen. Zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

Anwendung von DNA-Templates und Kontrollen

Fügen Sie 5,0 µL der folgenden Probentypen der vorbereiteten PCR Platte hinzu, welche bereits den PCR Mastermix enthält.

NTC: Fügen Sie 5,0 µL des Nuclease-Free Waters anstelle einer Probe den Wells H4 und H8 hinzu.

DNA-Probe: Fügen Sie 5,0 µL der vorbereiteten, verdünnten DNA Probe (2 – 4 ng/µL) hinzu.

PC: Fügen Sie 5,0 µL der unverdünnten DIP Positive Control (DPC) anstelle einer Probe den Wells G4 und G8 hinzu.

Restriktionsverdau

Die BIOTYPE Mentype® Digital-Assays sind spezifisch für den EcoRI-Restriktionsverdau.

Der Restriktionsverdau der zu analysierenden DNA vor der Tröpfchenerzeugung wird empfohlen. Der Verdau kann direkt im PCR-Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Verwenden Sie max. 1 µL FastDigest EcoRI-Enzym (siehe Tabelle 4), um bis zu 1 µg genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µL zu verdauen. Für die Verwendung von Non-FastDigest EcoRI Enzym werden 2 Einheiten pro 20 µL Reaktion empfohlen.

Nach der Vorbereitung der Screeningplatte mit PCR-Master-Mix, Proben-DNA und Kontrollen, verschließen Sie die Platte mit einer PCR-Folie (nicht mitgeliefert), mischen Sie gründlich (vortexen) und zentrifugieren Sie kurz.

Anschließend inkubieren Sie die Screeningplatte im Thermocycler für 10 min bei 37 °C für den Restriktionsverdau.

Droplet Digital™ PCR – Tröpfchenerzeugung

Für optimale Ergebnisse mischen Sie die in der Mentype® DigitalScreen Platte vorgegebenen Proben vor der Tröpfchenerzeugung durch auf- und ab pipettieren. Achten Sie darauf, hierbei keine Bläschen in den Reaktionsansatz einzubringen.

Platzieren Sie die DG8-Cartridge in den Cartridge Holder. Pipettieren Sie jede Probe (20 µL des verdauten PCR-Gemisches) ca. 3-mal auf und ab, bevor Sie die Probe in die mittlere Reihe der DG8-Cartridge übertragen (beachten Sie die allgemeinen Richtlinien von Bio-Rad für die Tröpfchenerzeugung).

Beginnen Sie mit dem Pipettieren des verdauten PCR-Mixes von A1 nach H1. Übertragen Sie die Proben in der DG8-Cartridge von links nach rechts.

Alle 8 Wells/Reaktionsgefäße der DG8 Cartridge müssen entweder mit Probe oder mit 1x ddPCR™ Buffer Control for Probes (nicht im Kit enthalten) befüllt werden.

Nach Übertragung aller 8 Proben, füllen Sie 70 µL Droplet Generation (DG) Öl in die unterste Reihe der DG8-Cartridge. Alle 8 Öl-Wells der DG8 Cartridge müssen DG Öl enthalten.

Spannen Sie die Gasket über die DG8-Cartridge, indem Sie die Löcher auf beiden Seiten verwenden.

HINWEIS



Nutzen Sie zur Befüllung der DG8 Cartridge stets die dafür vorgesehene Halterung. Das DG-Öl darf erst in die 8 Wells/Reaktionsgefäße der DG8 Cartridge verteilen werden, wenn alle 8 Wells/Reaktionsgefäße mit Probe befüllt wurden.

Platzieren Sie die gefüllte, noch immer im Cartridge Holder sitzende, DG8 Cartridge in das QX100™/QX200™ Droplet Generator Instrument und starten Sie die Generierung der Tröpfchen.

Nach der Tröpfchenerzeugung enthält die obere Reihe der DG8 Cartridge die generierten Tröpfchenproben. Übertragen Sie 40 µL der Tröpfchenproben in eine 96-Well-PCR-Platte. Verwenden Sie eine 8-Kanal-Pipette, um Zeit zu sparen.

Pipettieren Sie die weiteren Proben in folgender Reihenfolge: von Reihe A2– H2 nach Reihe A8 – H8.

HINWEIS

Handhaben Sie die Proben nach der Tröpfchenbildung vorsichtig (kein vortexen, kein zentrifugieren).

Zum Versiegeln der 96-well Platte legen Sie eine durchbohrbare Alu-Folie (Pierceable Foil Heat Seal) auf die Platte und verschweißen diese im PX1 Plate Sealer. Beachten Sie hierbei auch die Bio-Rad Bedienungsanleitung für den PX1 PCR Plate Sealer.

PCR Amplifikation

Wenn die Heißversiegelung abgeschlossen ist, stellen Sie die 96-well PCR-Platte in einen Thermocycler und starten Sie das Programm gemäß Tabelle 5. Beheizen Sie den Deckel mit 105 °C. Stellen Sie das Probenvolumen auf 40 µL ein.

* Die Einstellung der Heiz- und Kühlrate ist abhängig von dem Blockmaterial des PCR-Instruments:

- Für PCR-Zykler mit Aluminium-Block verwenden Sie eine Heiz- und Kühlrate von 2 °C/s.
- Für PCR-Zykler mit Silberblock verwenden Sie 1 °C/s;
- Wenn Sie das Blockmaterial nicht bestimmen können, verwenden Sie 1 °C/s.

Tabelle 5 PCR Protokoll für Mentype® DigitalScreen

Temperatur	Zeit	Zyklen	Heiz- und Kühlrate*
95 °C	10 min	1 x	
94 °C	30 s	40 x	2 °C/s
62 °C	60 s		
98 °C	10 min	1 x	
4 °C	∞	1 x	1 °C/s

Auslesen der Droplets

Nachdem die Amplifikation beendet ist, geben Sie die PCR-Platte mit den Proben-Tröpfchen in den Halter des QX100/QX200 Tröpfchenlesers.

HINWEIS



Die Platte sollte mit Sorgfalt behandelt werden. Die Platte darf weder gevortext noch zentrifugiert werden.

Öffnen Sie die Software Quanta™Soft von Bio-Rad. Erstellen Sie das Platten-Layout für Ihr Experiment (vgl. [Abbildung 2](#)). Öffnen Sie den Editor (Applied Well Settings) durch Doppelklick auf ein Well im Plattenlayout. Vergeben Sie den Proben-Namen, die Art des Experiments und legen Sie fest, welches Assay welchem Fluoreszenz-Kanal entspricht. Anschließend vergeben Sie Proben-Namen an die entsprechenden DNA-Proben.

Für die Analyse des Mentype® DigitalScreen Assays nutzen Sie die in [Tabelle 6](#) aufgeführten Einstellungen:

Tabelle 6 Festzulegende Einstellungen zur Analyse des Mentype® DigitalScreen Kits in der Software Quanta™Soft

Proben und Experiment Optionen	Einstellung
Sample	
Name	vergeben Sie einen Probennamen
Experiment	Absolute Quantification (ABS)
Supermix	ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)
Target 1	
Name	Marker Name z. B. DP67
Type	z. B. Ch 1 Unknown
Target 2	
Name	REF
Type	z. B. Ch 2 Unknown

HINWEIS



Alle spezifischen DIP-Marker (siehe [Tabelle 7](#)) sind mit FAM markiert. Die Referenz (REF) ist entsprechend mit HEX markiert.

Nach Erstellung des Platten-Layouts starten Sie durch klicken den **Run**.

Der Tröpfchenleser zählt fluoreszenz-positive und negative Tröpfchen für die absolute Quantifizierung der Ziel-DNA. Jedes probenenthaltende Tröpfchen wird sowohl für die FAM- als auch die HEX-Fluoreszenz individuell verarbeitet und verifiziert. Für die Konzentrationsberechnungen werden Daten von mindestens 10.000 akzeptierten Tröpfchen verwendet.

Datenanalyse

Generelle Bewertung

Laden Sie die Platte in das Setup-Fenster der Quanta™Soft Software (Bio-Rad). Klicken Sie auf **Analyze**, um die Daten zu öffnen und zu analysieren. Überprüfen Sie die Daten im 2D Amplitude-Kanal, um sicherzustellen, dass die automatisierte Clustertrennung korrekt ist (siehe [Abbildung 3](#)).

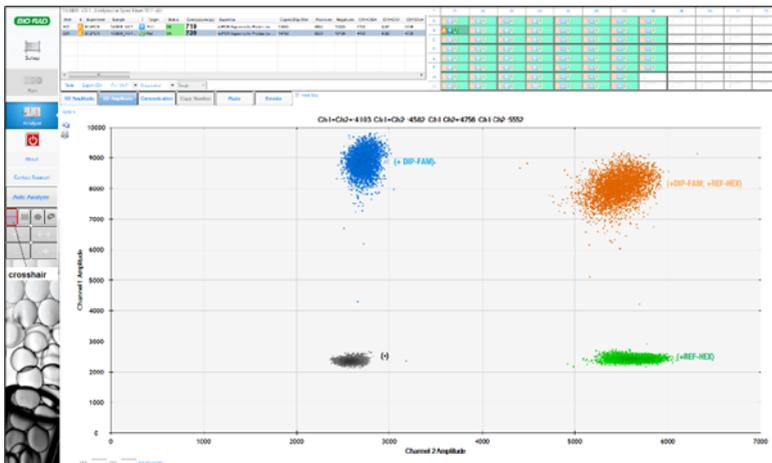


Abbildung 3 Ansicht 2D-Amplitude (Scatter Blot) der Tröpfchenfluoreszenz

Alle 4 Cluster (grau, grün, orange, blau) müssen vollständig getrennt sein (siehe [Abbildung 3](#)). Wenn Cluster nicht korrekt getrennt sind, müssen manuell Korrekturen vorgenommen werden. Verwenden Sie hierzu die links am Bildschirmrand angezeigten Tools (z. B. „crosshair“, Fadenkreuz). Die Tröpfchen interpretieren Sie wie folgt:

- doppelt negativ (grau),
- FAM positiv (blau),
- HEX positiv (grün) und
- doppelt positiv (orange - positiv für FAM und HEX im selben Tröpfchen).

Die manuelle Korrektur war erfolgreich, wenn die Farbe des Clusters bzw. einzelner Tröpfchen sich umwandelt und das Fadenkreuz rosa angezeigt ist. Wählen Sie anschließend die zu analysierenden Wells aus und klicken Sie auf **Table**.

Öffnen Sie anschließend die **Result Table** um die Ergebnisse einzusehen.

HINWEIS



Das Detektionslimit für ein erfolgreich durchgeführtes Experiment liegt bei fünf FAM-positiven Tröpfchen. Ein Ergebnis mit weniger als fünf Tröpfchen wird als negativ definiert, der FAM-Cluster wurde nicht erkannt.

Identifikation informativer Loci

Vergleichen Sie die FAM-Cluster der verschiedenen Ausgangs-DNA Proben. Loci, die in der Probe DNA 1 positiv und in der Probe DNA 2 negativ sind (vgl. [Abbildung 2](#)), werden für die absolute Quantifizierung mit den Mentype® DigitalQuant Duplex Assays empfohlen. Loci, die für die Probe DNA 2 positiv und für die Probe DNA 1 negativ sind, können jedoch ebenfalls zur Quantifizierung genutzt werden.

Um zu bestimmen, ob das identifizierte DIP-Allel (Allel of Interest, AOI) homozygot oder heterozygot ist, verwenden Sie die folgende Formel:

$$\text{Verhältnis in Prozent} = (100 \cdot \text{conc AOI}) / \text{conc REF}$$

Wenn das prozentuale Verhältnis von Kopien/μL AOI zu den Kopien/μL Referenz (REF) weniger als 65 % beträgt, ist das AOI im Marker heterozygot.

Ist das Verhältnis größer als 65 %, so ist der Marker homozygot.

Diese Information ist für die Berechnung der Quantifizierung mit Mentype® DigitalQuant zu beachten (siehe Handbuch Mentype® DigitalQuant).

Für eine statistisch gesicherte und robuste DNA Analyse, muss die Analyse mit 3 informativen Loci erfolgen. Nach der Auswahl der spezifischen Loci, können Sie die korrespondierenden Mentype® DigitalQuant Assays (vgl. Tabelle 10, Tabelle 11) bestellen.

Charakteristik und Verfügbarkeit der Mentype® DigitalQuant Assays

Tabelle 7 chromosomale Lokation der spezifischen Loci

Locus	Chromosomale Lokalisation	Locus	Chromosomale Lokalisation
67	5q33.3	133	3p22.1
70	6q16.1	134	5q11.2
88	9q22.33	140	3q23
97	13q13.1	152	16p13.2
101	15q26.1	163	12q24.31
104	13q32.1	301	17q21.32
105	14q24.3	304	9q34.3
106	16q13	307	Xp11.23
114	17p13.2	310	2p22.3
128	1q31.3	SRY	Yp11.2
131	7q36.2		

Tabelle 8 Verfügbare Mentype® DigitalQuant Assays

Loci	Deletion (- Allel)	Insertion (+ Allel)	Allele-spezifische Duplex-Assay mit Aktiver Referenz (REF)	Allele-spezifische Duplex-Assay mit Markern für die Y- chromosomale Region (SRY)
67	67-D		DP67-D+REF	DP67-D+SRY
70	70-D		DP70-D+REF	DP70-D+SRY
		70-I	DP70-I+REF	DP70-I+SRY
88	88-D		DP88-D+REF	DP88-D+SRY
		88-I	DP88-I+REF	DP88-I+SRY
97		97-I	DP97-I+REF	DP97-I+SRY
101	101-D		DP101-D+REF	DP101-D+SRY
		101-I	DP101-I+REF	DP101-I+SRY
104	104-D		DP104-D+REF	DP104-D+SRY
		104-I	DP104-I+REF	DP104-I+SRY
105	105-D		DP105-D+REF	DP105-D+SRY
		105-I	DP105-I+REF	DP105-I+SRY
106		106-I	DP106-I+REF	DP106-I+SRY
114	114-D		DP114-D+REF	DP114-D+SRY
		114-I	DP114-I+REF	DP114-I+SRY
128	128-D		DP128-D+REF	DP128-D+SRY
131		131-I	DP131-I+REF	DP131-I+SRY
133		133-I	DP133-I+REF	DP133-I+SRY
134		134-I	DP134-I+REF	DP134-I+SRY
140		140-I	DP140-I+REF	DP140-I+SRY
152	152-D		DP152-D+REF	DP152-D+SRY
163	163-D		DP163-D+REF	DP163-D+SRY
		163-I	DP163-I+REF	DP163-I+SRY
301	301-D		DP301-D+REF	DP301-D+SRY
		301-I	DP301-I+REF	DP301-I+SRY
304	304-D		DP304-D+REF	DP304-D+SRY
		304-I	DP304-I+REF	DP304-I+SRY
307		307-I	DP307-I+REF	DP307-I+SRY

Loci	Deletion (- Allel)	Insertion (+ Allel)	Allele-spezifische Duplex-Assay mit Aktiver Referenz (REF)	Allele-spezifische Duplex-Assay mit Markern für die Y- chromosomale Region (SRY)
310		310-I	DP310-I+REF	DP310-I+SRY
SRY		SRY	DPSRY+REF	

Qualitätskontrolle

Alle Kitkomponenten durchlaufen bei der BIOTYPE GmbH einen intensiven Qualitätssicherungsprozess. Die Qualität der Testkits wird permanent überwacht, um eine uneingeschränkte Verwendbarkeit zu gewährleisten. Bitte kontaktieren Sie uns, wenn Sie Fragen zur Qualitätssicherung haben.

Technische Unterstützung

Für technische Beratung wenden Sie sich bitte an unseren Kundensupport:

E-mail: support@biotype.de

Telefon: +49 (0)351 8838 400

Referenzen

Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E. (2002) Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 99, 4618-4625.

Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9236-9241.

George D, Czech J, John B, Yu M, Jennings LJ (2013) Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism*, 4:102-108.

Manoj P (2014) Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas. Mitochondrial DNA 2014, e-published ahead of print [doi: 10.3109/19401736.2014.913168].

Jim F. Huggett, Carole A. Foy, Vladimir Benes, Kerry Emslie, Jeremy A. Garson, Ross Haynes, Jan Hellemans, Mikael Kubista, Reinhold D. Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, Carl T. Wittwer, and Stephen A. Bustin¹³ (2013) Guidelines for Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. Clinical Chemistry 2013.206375.

Einschränkungen

- Die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren müssen genau eingehalten werden. Jegliche Abweichungen können zum Versagen des Assays oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in dPCR-Techniken geschult und ausgebildet ist.
- Für die optimale Durchführung dieses Tests sind geeignete Verfahren für die Entnahme, den Transport, die Lagerung und die Verarbeitung der Proben erforderlich.
- Dieser Assay darf nicht direkt an der Probe durchgeführt werden. Vor der Verwendung dieses Assays müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.
- Das Kit wurde nur mit den beschriebenen Kits und Verfahren verifiziert.
- Gute Laborpraxis ist erforderlich, um die Leistung des Kits zu gewährleisten.
- Die Ergebnisse müssen von einem geschulten professionellen Anwender interpretiert werden.
- Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Komponenten.

Bestellinformation

Richten Sie Ihre Bestellungen per E-Mail an sales@biotype.de.

Tabelle 9 Generelle Bestellinformationen zu Mentype® DigitalScreen und DIP Positive Control

Produkt	Verpackungsgröße	Bestellnummer
Mentype® DigitalScreen	4 Platten (4 x 2 DNA-Paare)	45-64610-0004
DIP Positive Control	20 Reaktionen	27-13201-0100

Tabelle 10 Bestellinformation der allel-spezifischen Mentype® DigitalQuant Assays, diese Assays stehen Ihnen jederzeit zur Verfügung (Lagerhaltung)

Assay	25 Reaktionen
DP67-D+REF	45-02011-0025
DP70-D+REF	45-02021-0025
DP70-I+REF	45-02031-0025
DP88-D+REF	45-02041-0025
DP88-I+REF	45-02051-0025
DP97-I+REF	45-02061-0025
DP101-D+REF	45-02071-0025
DP101-I+REF	45-02081-0025
DP104-D+REF	45-02091-0025
DP104-I+REF	45-02101-0025
DP105-D+REF	45-02111-0025
DP105-I+REF	45-02121-0025
DP106-I+REF	45-02131-0025
DP114-D+REF	45-02141-0025
DP114-I+REF	45-02151-0025
DP128-D+REF	45-02161-0025
DP131-I+REF	45-02171-0025
DP133-I+REF	45-02181-0025

Assay	25 Reaktionen
DP134-I+REF	45-02191-0025
DP140-I+REF	45-02201-0025
DP152-D+REF	45-02211-0025
DP163-D+REF	45-02221-0025
DP163-I+REF	45-02231-0025
DP301-D+REF	45-02241-0025
DP301-I+REF	45-02251-0025
DP304-D+REF	45-02261-0025
DP304-I+REF	45-02271-0025
DP307-I+REF	45-02281-0025
DP310-I+REF	45-02291-0025
DPSRY+REF	45-02301-0025

Tabelle 11 Bestellinformation der allel-spezifischen Mentype® DigitalQuant Assays, diese Assays werden auf Anforderung hergestellt (On-Demand)

Assay	25 Reaktionen
DP67-D+SRY	45-02311-0025
DP70-D+SRY	45-02321-0025
DP70-I+SRY	45-02331-0025
DP88-D+SRY	45-02341-0025
DP88-I+SRY	45-02351-0025
DP97-I+SRY	45-02361-0025
DP101-D+SRY	45-02371-0025
DP101-I+SRY	45-02381-0025
DP104-D+SRY	45-02391-0025
DP104-I+SRY	45-02401-0025
DP105-D+SRY	45-02411-0025
DP105-I+SRY	45-02421-0025
DP106-I+SRY	45-02431-0025
DP114-D+SRY	45-02441-0025
DP114-I+SRY	45-02451-0025
DP128-D+SRY	45-02461-0025

Assay	25 Reaktionen
DP131-I+SRY	45-02471-0025
DP133-I+SRY	45-02481-0025
DP134-I+SRY	45-02491-0025
DP140-I+SRY	45-02501-0025
DP152-D+SRY	45-02511-0025
DP163-D+SRY	45-02521-0025
DP163-I+SRY	45-02531-0025
DP301-D+SRY	45-02541-0025
DP301-I+SRY	45-02551-0025
DP304-D+SRY	45-02561-0025
DP304-I+SRY	45-02571-0025
DP307-I+SRY	45-02581-0025
DP310-I+SRY	45-02591-0025

Marken und Haftungsausschluss

Mentype® ist eine eingetragene Marke der BIOTYPE GmbH.

Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, sind nicht als gesetzlich ungeschützt zu betrachten.

© 2025 BIOTYPE GmbH; alle Rechte vorbehalten.

Symbole



Hersteller



Chargenbezeichnung



Ausreichend für <N> Tests



Hinweis auf die eIFU



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung



Artikelnummer



Vor Licht schützen



Trocken aufbewahren

Weitere in diesem Handbuch verwendete Bezeichnungen:



Nützliche Tipps



Achtung, beachten Sie unbedingt diesen Hinweis!

[Blau
unterstrichener
Text](#)

Links, die zu externen Inhalten wie Homepages oder E-Mail-Adressen führen

Schwarz
unterstrichener
Text

Querverweise im Dokument zur einfachen Navigation

**Schwarzer,
fetter, kursiver
Text**

Felder, die in einer Software angeklickt werden sollen

BIOTYPE GmbH

Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN, GERMANY

Tel.: +49 351 8838 400

Fax: +49 351 8838 403

www.biotype.de

Bestellungen

sales@biotype.de

Kundenservice & Support

support@biotype.de

