

Mentype® DigitalQuant

Handbuch

RUO

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für
medizinische Diagnostik

DGQHB01v3de

11.04.2025

REF

45-02xx1-0025*

LOT

Chargennummer



BIOTYPE GmbH
Moritzburger Weg 67
01109 DRESDEN
GERMANY

Website: www.biotype.de
Email: support@biotype.de
Bestellung: sales@biotype.de

* xx - legt die locus-spezifische Artikelnummer fest

Änderungshinweis

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

Dokumentnummer	Änderungen	Datum
DGQHB01v1de	Initiale Version des Handbuchs	09.03.2022
DGQHB01v2de	Ergänzung des Workflows für den QuantStudio Absolute Q, Entfernung des QuantStudio 3D (diskontinuiert)	13.02.2025
DGQHB01v3de	Neue Artikelnummer für DIP Positive Control Ergänzung des Workflows für das QIAcuity Digital PCR System	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
Allgemeine Reagenzien und Kits unabhängig von der dPCR Plattform ...	7
Probenmaterial	7
Warnungen und Sicherheitshinweise	8
Durchführung	9
Probenvorbereitung	9
Vorbereitung der Kontrollproben	9
Optional: Bestimmung des Allelstatus der informativen Loci	10
Quantifizierungsprotokoll.....	10
Protokoll für die droplet digital™ PCR (ddPCR™ von Bio-Rad)	11
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	11
Experimenteller Ablauf	12
Datenanalyse	18
Protokoll für den QuantStudio™ Absolute Q™ (Thermo Fisher Scientific)	20
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	20
Experimenteller Ablauf	21
Datenanalyse	23
Protokoll für das QIAcuity Digital PCR System (Qiagen)	26
Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien	26
Experimenteller Ablauf	27
Datenanalyse	29
Berechnung der absoluten DNA-Proportionen	31
Charakteristik und Verfügbarkeit der Mentype® DigitalQuant Assays	32

Qualitätskontrolle	34
Technische Unterstützung	34
Referenzen	34
Einschränkungen	35
Bestellinformation	36
Marken und Haftungsausschluss	38
Symbole	39

Produktbeschreibung

Das Testkit Mentype® DigitalQuant ist zur absoluten Quantifizierung von DNA-Anteilen aus Mischproben bestimmt.

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® DigitalQuant 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 Kompartimenten. Jedes Kompartiment stellt ein separates Reaktionsgefäß dar, welches Nanoliter der Probe enthält und als separate PCR-Reaktionskammer fungiert. Je nachdem, wie viele Exemplare der Ziel-DNA-Moleküle in die Kompartimente aufgeteilt wurden (Null, eine oder mehrere Kopien), wird eine Vielzahl von Replikaten in jedem einzelnen PCR-Lauf erzeugt. Mit Hilfe der Poisson-Statistik kann die absolute Anzahl der Startkopien sehr genau bestimmt werden. Nach der PCR wird jedes Kompartiment automatisch analysiert und für die Ziel-DNA der positive oder negative Anteil bestimmt. Da bei der digitalen PCR der end-point Nachweis des Amplifikationsprodukts verwendet wird, sind Kalibrierungskurven nicht erforderlich.

Mentype® DigitalQuant-Assays wurden entwickelt, um zuvor identifizierte DIP-Loci (Deletion-Insertion-Polymorphismus, auch INDEL genannt) quantitativ zu analysieren. Diese Assays stellen ein Set von 29 verschiedenen DIP-Allelen dar und sind als Duplexmischungen entweder in Kombination mit β -Globin als aktiver Referenz (REF) oder mit SRY als Y-Chromosom-spezifischer Marker erhältlich. Zusätzlich wird eine Kombination von SRY / REF als Assay bereitgestellt. (siehe Abbildung 1).

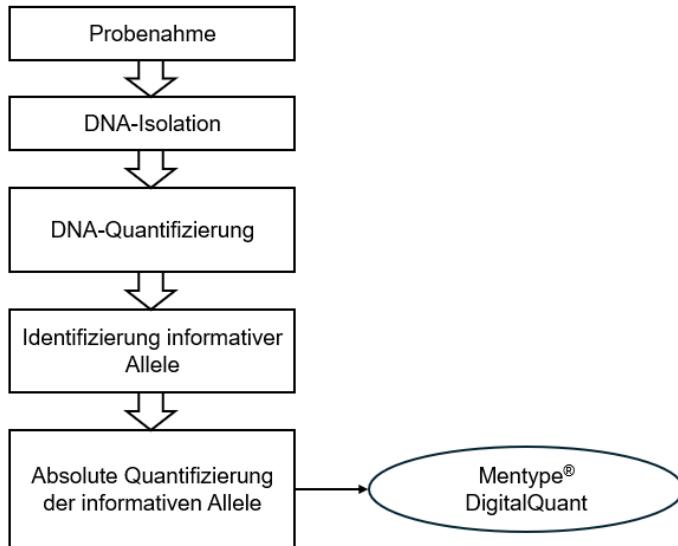


Abbildung 1 Von der Probe bis zur Analyse mit dem Mentype® DigitalQuant

Alle spezifischen DIP-Marker (siehe Tabelle 18) sind mit FAM markiert, die aktive Referenz (REF) und die SRY Y-chromosomenspezifischen Marker werden über den HEX-Kanal (bzw. bei Nutzung des QuantStudio™ Systems VIC-Kanal) detektiert. Da alle verfügbaren Assays mit den gleichen Parametern durchgeführt werden, kann eine parallele Analyse von mehreren DIP-Markern in einem Analyseansatz erfolgen.

Mitgelieferte Materialien

Die folgenden Reagenzien zur Durchführung des Kits Mentype® DigitalQuant 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	1 x 1,5 mL	
Mentype® DigitalQuant Primer Mix	Mentype® DigitalQuant Primer Mix	Rot	1 x 63 µL	-25 °C bis -15 °C

HINWEIS



Bitte beachten Sie, dass die Verpackungsgröße die Anzahl der Testungen beschreibt, ohne die Anzahl der erforderlichen Kontrollen oder den erforderlichen Überschuss zum Pipettieren zu berücksichtigen.

Reagenzienlagerung und -handhabung

Das Kit wird auf Trockeneis versandt. Die Bestandteile des Kits sollten gefroren ankommen. Bitte überprüfen Sie die Vollständigkeit des Kits bei Erhalt. Verwenden Sie keine Kits, die bei der Ankunft aufgetaut wurden. Wenn eine oder mehrere Komponenten nicht gefroren sind oder wenn die Röhrchen oder die Verpackung während des Transports beschädigt wurden, kann die Leistung nicht garantiert werden.

Lagern Sie alle Komponenten lichtgeschützt bei -25 °C bis -15 °C. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Etikett der Kit-Verpackung angegeben. Die Anzahl von 10 Frieren-Tauen-Zyklen sollte nicht überschritten werden.

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 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.

Allgemeine Reagenzien und Kits unabhängig von der dPCR Plattform

Tabelle 2 Erforderliche aber nicht mitgelieferte Materialien

Reagenz	Anbieter	Bestellnummer
DIP Positive Control, 20 reactions	BIOTYPE GmbH	27-13201-0100
QIAamp DNA Blood Mini Kit, 50 Preps	Qiagen	51104
NucleoSpin Blood L Kit, 20 Preps	Macherey-Nagel	740954.20

Probenmaterial

Das folgende Probenmaterial wurde mit den Mentype® DigitalQuant Kits verifiziert:

- DNA, extrahiert aus peripheren venösen Blutproben
- DNA, extrahiert aus Knochenmark

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.

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.

Durchführung

Probenvorbereitung

Probenahme und DNA Extraktion

Dieser Test ist für die Verwendung von genomischer DNA, welche aus peripheren Blutproben sowie Knochenmark extrahiert wurde, vorgesehen. Die Nutzung anderer Proben (z. B. sortierte Zellen) muss vom Anwender eigenverantwortlich validiert werden. Die Probenahme kann über standardmäßig verwendete Blutentnahmeröhrchen stattfinden. Die Proben sollten nach der Entnahme gekühlt (4-8 °C) gelagert werden und so bald wie möglich zur DNA-Extraktion genutzt werden. Zur gDNA-Extraktion sollten kommerziell erhältliche Kits zur Isolation von genomischer DNA verwendet werden. Die folgenden Kits werden zur DNA-Extraktion empfohlen:

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

Konzentrierte gDNA kann durch Verdünnung mit 1x TE-Puffer auf die benötigte Konzentration eingestellt werden. gDNA sollte bei -25 °C bis -15 °C gelagert 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.

Optional: Bestimmung des Allelstatus der informativen Loci

Falls der Allelstatus der informativen Loci nicht vorliegt, muss dieser vor der Berechnung der DNA-Anteile der Mischprobe bestimmt werden. Hierzu analysieren Sie die Ausgangsprobe mit dem entsprechenden informativen Mentype® DigitalQuant Marker. Es wird der Einsatz von 10-25 ng DNA in die Reaktion empfohlen. Nach erfolgter Analyse der Ausgangsprobe wird der Allelstatus berechnet.

Wenn das prozentuale Verhältnis der Konzentration (Kopien/ μ L) im FAM-Kanal (AOI, Allele of Interest, DIP-Loci oder SRY) zu der Konzentration (Kopien/ μ L) im HEX- bzw. VIC-Kanal (REF) weniger als 65 % beträgt, ist das AOI im Marker heterozygot. Ist das Verhältnis größer als 65 %, so handelt es sich um einen homozygoten Marker. Die daraus resultierenden Berechnungsformeln entnehmen Sie im Folgenden den Tabelle 13 - Tabelle 16.

$$\text{Verhältnis [%]} = \frac{(100 * \text{conc(copies}/\mu\text{L}) \text{ AOI})}{\text{conc(copies}/\mu\text{L}) \text{ REF}}$$

Quantifizierungsprotokoll

Generell wird die Quantifizierung mit Mentype® DigitalQuant durch das Verhältnis der Konzentration des informativen DIP-Locus (FAM, Konzentration (Kopien/ μ L) zur Konzentration von REF oder SRY (HEX bzw. VIC Kanal, Konzentration (Kopien/ μ L) innerhalb eines Duplex-Assays berechnet.

HINWEIS

Für eine statistisch gesicherte und robuste DNA-Analyse wird die Analyse von mindestens 2 und optimal 3 informativen Loci empfohlen.

Protokoll für die droplet digital™ PCR (ddPCR™ von Bio-Rad)

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 spezielle Geräte und Verbrauchsmaterialien für die droplet digital PCR (Bio-Rad)

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Bestellnummer
2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP), 5 x 1 mL	Bio-Rad Laboratories	1863024
FastDigest EcoRI, 800 reactions	Thermo Fisher Scientific	FD0274
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, 1 x	Bio-Rad Laboratories	1863051
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, 100 x	Bio-Rad Laboratories	17005225
ddPCR™ 96-Well Plates, semi-skirted, 25 x	Bio-Rad Laboratories	17005224

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Bestellnummer
ddPCR™ Buffer Control for Probes, 2 x 4,5 mL	Bio-Rad Laboratories	1863052
96-well PCR Folie	beliebig	verschiedene

Geräte und Software

Das Testkit Mentype® DigitalQuant wurde mit dem Bio-Rad QX100™ und QX200™ Droplet Digital™ PCR System und den folgenden Thermocyclern validiert:

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

Experimenteller Ablauf

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. 5 s) ab. Lagern Sie das Enzym während der Benutzung auf einem Kühlrack.

- Nuclease-Free Water (blauer Deckel, im Kit enthalten)
- Mentype® DigitalQuant Primer Mix (roter 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 entsprechend Tabelle 4 vor.

Tabelle 4 PCR Mastermix Ansatz

Komponente	Volumen pro Reaktion
Nuclease-Free Water	2,5 µL
2x ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)	10,0 µL
Mentype® DigitalQuant Primer Mix	2,0 µL
FastDigest EcoRI enzyme	0,5 µL
Volumen Mastermix/Well	15,0 µL
DNA Template (10 ng/µL) oder Kontrollproben	5,0 µL

HINWEIS



Die Nachweisgrenze und Sensitivität der Mentype® DigitalQuant Analyse hängt von der Qualität und Menge der verwendeten DNA ab. Die allelenspezifische Primermischung ist für maximale Spezifität und Sensitivität (0,1 %) auf die Verwendung von 50 ng gereinigter Gesamt-DNA optimiert

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 PCR-Reaktionsgefäße, vortexen Sie kurz und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

Zugabe von DNA-Templates und Kontrollen

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

NTC: Fügen Sie 5,0 µL des Nuclease-Free Waters anstelle einer Probe hinzu.

DNA-Probe: Fügen Sie 5,0 µL der vorbereiteten, verdünnten DNA Probe (10 ng/µL) hinzu.

PC: Fügen Sie 5,0 µL der unverdünnten DIP Positive Control (DPC) anstelle einer Probe 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 Vorbereitung der PCR-Reaktionsgefäß mit Mastermix, DNA und Kontrollen, werden diese verschlossen, gemischt (vortexen) und kurz abzentrifugiert.

Anschließend inkubieren Sie das Gemisch im Thermocycler für 10 min bei 37 °C für den Restriktionsverdau.

Droplet Digital™ PCR – Tröpfchenerzeugung

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. Übertragen Sie die Proben in der DG8-Cartridge von links nach rechts. Alle 8 Wells 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 DG 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 jeweils neue Cartridges.

HINWEIS



Handhaben Sie die Proben nach der Tröpfchenbildung vorsichtig (kein vortexen, kein zentrifugieren). Starten Sie sofort, jedoch maximal 2 Stunden nach Abschluss der ersten Tröpfchengenerierung die PCR Amplifikation.

Zum Versiegeln der 96-well Platte legen Sie eine perforierbare 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. Stellen Sie das Probenvolumen auf 40 µL ein.

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

- Für PCR-Cycler mit Aluminium-Block verwenden Sie eine Heiz- und Kühlrate von 2 °C/s.
- Für PCR-Cycler 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® DigitalQuant (Anwendung mit QX100/QX200)

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

Auslesen der Droplets

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

HINWEIS



Platte nicht vortexen und nicht zentrifugieren! Vorsichtiger Umgang ist geboten, um eine Beschädigung der Droplets zu vermeiden.

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 die Probennamen an die entsprechenden DNA-Proben.

Für die Analyse des Mentype® DigitalQuant Assays nutzen Sie die in Tabelle 6 aufgeführten Einstellungen:

Tabelle 6 Festzulegende Einstellungen zur Analyse der Mentype® DigitalQuant Assays in der Software Quanta™Soft

Proben und Experiment Optionen	Einstellungen
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 17](#)) sind mit FAM markiert. Die Referenz (REF oder SRY) ist entsprechend mit HEX markiert.

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

Der Droplet Reader 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 nur Daten von Proben verwendet, wenn mindestens 10.000 akzeptierten Tröpfchen analysiert wurden. Diesen Wert finden Sie in der Datentabelle **Table** der Software Quanta™Soft, Spalte **AcceptedDroplets**, oder in der Ansicht **Events**, bezeichnet als total.

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 Amplituden-Kanal, um sicherzustellen, dass die automatisierte Clustertrennung korrekt ist (siehe Abbildung 2).

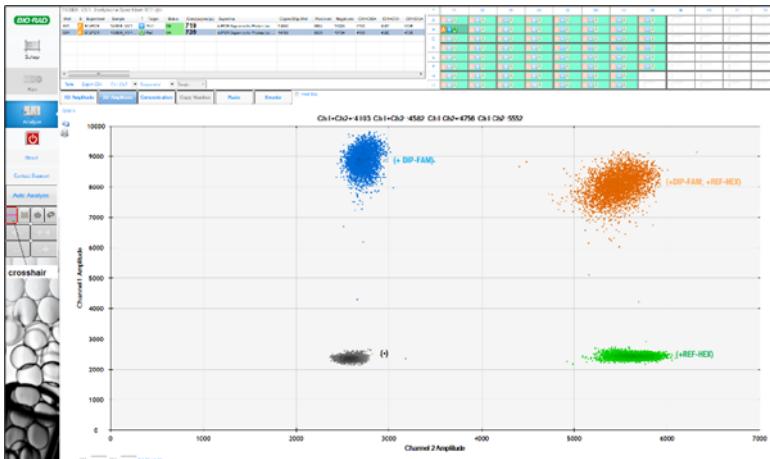


Abbildung 2 Ansicht 2D-Amplitude (Scatter Blot) der Tröpfchenfluoreszenz

Alle 4 Cluster (grau, grün, orange, blau) müssen vollständig getrennt sein (siehe Abbildung 2). 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.

Mindestanforderungen an Dropletdata vor der Berechnung

Bevor der Anteil der Mischprobe berechnet wird, sollten die Daten hinsichtlich ihrer Qualität überprüft werden:

- Pro Probe sollten mindestens 10.000 Droplets erkannt und analysiert werden.
- Das Detektionslimit für ein erfolgreich durchgeführtes Experiment liegt bei fünf FAM-positiven Tröpfchen. Hierbei kann die Amplifikation im FAM-Kanal alleine (blaues Cluster) sowie im FAM- und HEX-positiven Cluster (oranges Cluster) vorliegen. Ein Ergebnis mit weniger als fünf Tröpfchen wird als negativ definiert.

Protokoll für den QuantStudio™ Absolute Q™ (Thermo Fisher Scientific)

HINWEIS



Bei Nutzung des QuantStudio Absolute Q wird die Verwendung des DP301-D+Ref wegen verringriger Leistung nicht empfohlen.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 Zusätzliche Verbrauchsmaterialien für den QuantStudio Absolute Q (Thermo Fisher Scientific)

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Artikelnummer
AbsoluteQ™ DNA Digital Master Mix (5x), 200 Reaktionen	Thermo Fisher Scientific	A52490
QuantStudio™ Absolute Q™ MAP16 Plate Kit, 12 plates	Thermo Fisher Scientific	A52865

Gerät und Software

Das Testkit wurde mit dem QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific, A52864) und der folgenden Software verifiziert:

- QuantStudio™ Absolute Q™ Digital PCR Software (Version 6.2.0)

Experimenteller Ablauf

Mastermix Ansatz

Bereiten Sie die folgenden Komponenten vor und tauen Sie die Reagenzien nach Bedarf auf und homogenisieren Sie sie. Anschließend sollten die Reagenzien kurz zentrifugiert werden (ca. 5 s).

- Nuclease-free Water (hellblauer Deckel, im Kit enthalten)
- Mentype® DigitalQuant Primer Mix (roter Deckel, im Kit enthalten)
- AbsoluteQ™ DNA Digital Master Mix
- AbsoluteQ™ Isolation Buffer

Bereiten Sie den PCR-Mastermix gemäß Tabelle 8 vor. Berücksichtigen Sie bei der Berechnung des erforderlichen Mastermixvolumens die Anzahl der positiven und negativen Kontrollreaktionen. Fügen Sie zu dieser Zahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Tabelle 8: PCR Mastermix

Komponente	Volumen pro Reaktion
Nuclease-Free Water	5,0 µL
AbsoluteQ™ DNA Digital Master Mix	2,0 µL
Mentype® DigitalQuant Primer Mix	1,0 µL
Volumen Mastermix/Well	8,0 µL
DNA Template* (25 ng/µL) oder Kontrollprobe	2,0 µL

* für DNA-Proben mit schlechter Qualität kann das Volumen auf 7µL erhöht werden, wenn das Volumen des Nuklease-freien Wassers entsprechend angepasst wird

HINWEIS



Die Nachweisgrenze und Sensitivität der Mentype® DigitalQuant Analyse hängt von der Qualität und Menge der verwendeten DNA ab. Die allelenspezifische Primermischung ist für maximale Spezifität und Sensitivität (0,1 %) auf die Verwendung von 50 ng gereinigter Gesamt-DNA optimiert.

Zugabe von DNA-Templates und Kontrollen

Fügen Sie 2,0 µL der folgenden Probentypen den vorbereiteten PCR-Reaktionsgefäßeln hinzu, welche bereits den PCR Mastermix enthält.

NTC: Fügen Sie 2,0 µL des Nuclease-Free Waters anstelle einer Probe hinzu.

DNA-Probe: Fügen Sie 2,0 µL der vorbereiteten, verdünnten DNA Probe (25 ng/µL) hinzu.

PC: Fügen Sie 2,0 µL der unverdünnten DIP Positive Control (DPC) anstelle einer Probe hinzu.

HINWEIS



Bei Verwendung der QuantStudio Absolute Q Plattform ist kein Restriktionsverdau des DNA Templates erforderlich.

Beladen des Arrays

Achten Sie bei der Handhabung der MAP16-Plate darauf, dass Sie nur den äußereren Rahmen berühren, um Beschädigungen und Verunreinigungen zu vermeiden. Führen Sie alle Methoden auf einer flachen, staubfreien Oberfläche durch, um die Integrität der Proben und der Platte zu erhalten. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie immer eine neue Pipettenspitze für jedes Well.

Füllen Sie 9 µL des PCR-Mix ein, indem Sie die Pipette in einem 45°-Winkel halten und den Mix auf den Boden des Wells geben. Drücken Sie die Pipette nur bis zum ersten Anschlagpunkt, um Luftblasen zu vermeiden.

Fügen Sie 15 µL des Absolut Q Isolation Buffer auf die gleiche Weise hinzu, indem Sie die Pipette in einem 45°-Winkel halten und nur bis zum ersten Anschlagpunkt drücken.

Legen Sie schließlich 5 Dichtungen auf die MAP16-Plate und achten Sie darauf, dass die mit „A“ markierten Enden mit der Oberseite der Platte ausgerichtet sind.

Setzen Sie die Platte in das Gerät ein.

Wenn Sie diese Schritte befolgen, können Sie eine genaue und kontaminationsfreie Handhabung der MAP16-Plate und ihrer Komponenten gewährleisten.

Amplifikation und Laufparameter

Wählen Sie die verwendeten Spalten der MAP-Plate innerhalb der Platemap der Software aus.

Führen Sie den Lauf unter Verwendung der Amplifikationsparameter aus wie in Tabelle 9 durch und wählen Sie die Detektion des FAM- und HEX-Kanals aus:

Tabelle 9 PCR-Protokoll für den Mentype® DigitalQuant auf dem Quantstudio Absolute Q

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	10 min	1 x
96 °C	5 s	
62 °C	30 s	40 x
4 °C	∞	1 x

HINWEIS



Ungenutzte Spalten der MAP-Plate können in einem weiteren Lauf verwendet werden.

Datenanalyse

Generelle Bewertung

Importieren Sie den abgeschlossenen Lauf in das Fenster **Runs** (Läufe) der Absolute Q™ Digital PCR Software (Thermo Fisher Scientific). Öffnen Sie die Registerkarte **Analysis**, um die Ergebnisse anzuzeigen. Klicken Sie auf Probe, wählen Sie alle Kanäle aus und wählen Sie dann die 2D-Plot-Ansicht. Überprüfen Sie die Daten im 2D-Amplitudenkanal, um zu überprüfen, ob der

automatische Threshold und die Clustertrennung korrekt sind (siehe Abbildung 3)

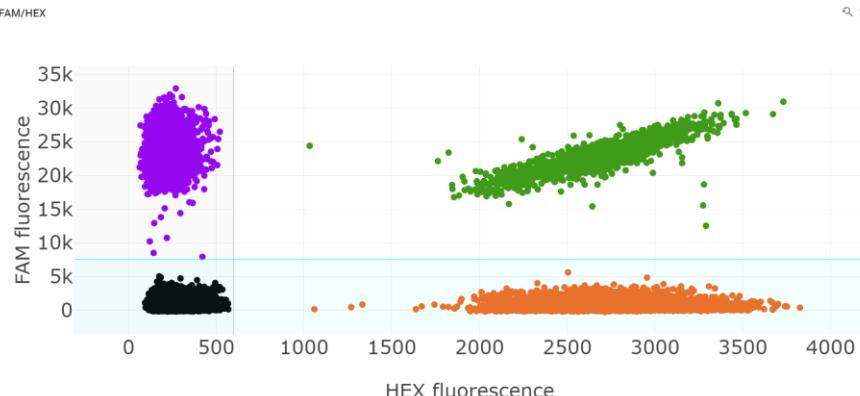


Abbildung 3 2D Amplitude (Scatter Plot) der Fluoreszenzen

Alle 4 Cluster (schwarz, grün, orange, lila) müssen vollständig getrennt erscheinen (siehe Abbildung 3). Wenn die Cluster nicht genau getrennt sind oder der automatische Threshold nicht korrekt ist, müssen Sie manuell Korrekturen vornehmen. Verwenden Sie daher die Option **Edit Analysis**, um die Schwellenwerte anzupassen. Bitte beziehen Sie sich bei der manuellen Anpassung der Schwellenwerte immer auf die Amplituden der Positivkontrolle. Die Ereignisse werden wie folgt interpretiert:

- doppelt negativ (schwarz),
- FAM positiv (violett),
- HEX positiv (orange) und
- doppelt positiv (grün - positiv für FAM und HEX in derselben Kavität).

Durch Speichern der manuellen Anpassung werden die Events automatisch von der Software berechnet.

Die analysierten Daten können auf der Registerkarte **Results** überprüft und heruntergeladen werden.

HINWEIS



Aufgrund von Unterschieden in den Signalamplituden wird empfohlen, auf jeder Platte eine Referenzprobe/Positivkontrolle zu analysieren, um den korrekten Threshold zu ermitteln, indem die Option **Group** in der Absolute Q™ Digital PCR Software verwendet wird.

Mindestanforderungen an die Daten vor der Berechnung

Bevor das Verhältnis der DNA-Mischprobe berechnet wird, sollten die Daten auf ihre Qualität geprüft werden.

- Wells mit weniger als 20.000 gültigen Events werden von der Software automatisch von der Auswertung ausgeschlossen.
- Alle Cluster müssen entsprechend dem Amplifikationsprofil der Positivkontrolle getrennt werden.

Protokoll für das QIAcuity Digital PCR System (Qiagen)

HINWEIS



Bei Nutzung des QIAcuity Digital PCR Systems wird die Verwendung des DP301-D+Ref wegen verringriger Leistung nicht empfohlen.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Materialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10 Zusätzliche Verbrauchsmaterialien für das QIAcuity Digital PCR System (Qiagen)

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Artikelnummer
QIAcuity Probe PCR Kit (5 mL)	Qiagen	250102
QIAcuity Nanoplate 26k 24-Well (10)	Qiagen	250001
QIAcuity Nanoplate Seals (11)	Qiagen	250099
QIAcuity Nanoplate Tray (2)	Qiagen	250098
QIAcuity Roller	Qiagen	911106

Gerät und Software

Der Testkit wurde mit dem QIAcuity Digital PCR System (Qiagen GmbH, 911042) und der folgenden Software verifiziert:

- QIAcuity Software Suite 2.5.0.1

Experimenteller Ablauf

Mastermix Ansatz

Bereiten Sie die folgenden Komponenten vor und tauen Sie die Reagenzien nach Bedarf auf und homogenisieren Sie sie. Anschließend sollten die Reagenzien kurz zentrifugiert werden (ca. 5 s).

- Nuclease-free Water (hellblauer Deckel, im Kit enthalten)
- Mentype® DigitalQuant Primer Mix (roter Deckel, im Kit enthalten)
- 4x QIAcuity Probe Mastermix

Bereiten Sie den PCR-Mastermix gemäß [Tabelle 11](#) vor. Berücksichtigen Sie bei der Berechnung des erforderlichen Mastermixvolumens die Anzahl der positiven und negativen Kontrollreaktionen. Fügen Sie zu dieser Zahl ein oder zwei Reaktionen hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren.

Tabelle 11: PCR Mastermix

Komponente	Volumen pro Reaktion
Nuclease-Free Water	21,0 µL
4x QIAcuity Probe Mastermix	10,0 µL
Mentype® DigitalQuant Primer Mix	4,0 µL
Volumen Mastermix/Well	35,0 µL
DNA Template* (20 ng/µL) oder Kontrollprobe	5,0 µL

* beim Einsatz höherer DNA-Volumina muss das Volumen an Nuclease-Free Water entsprechend reduziert werden. Das Reaktionsvolumen muss insgesamt immer 40 µL betragen.

HINWEIS



Die Nachweisgrenze und Sensitivität der Mentype® DigitalQuant Analyse hängt von der Qualität und Menge der verwendeten DNA ab. Die allel spezifische Primermischung ist für maximale Spezifität und Sensitivität (bis 0,1 %) auf die Verwendung von 100 ng gereinigter Gesamt-DNA optimiert.

Mischen Sie den PCR-Mastermix vorsichtig, ohne Blasen zu erzeugen, und zentrifugieren Sie ihn anschließend kurz.

Aliquotieren Sie 35 µL des PCR-Mastermixes in geeignete 200 µL PCR-Gefäße oder in eine PCR-Platte.

Zugabe von DNA-Templates und Kontrollen

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

NTC: Fügen Sie 5,0 µL des Nuclease-Free Waters anstelle einer Probe hinzu.

DNA-Probe: Fügen Sie 5,0 µL der vorbereiteten, verdünnten DNA Probe (20 ng/µL) hinzu.

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

HINWEIS



Bei Verwendung der QuantStudio Absolute Q Plattform ist kein Restriktionsverdau des DNA Templates erforderlich.

Beladen des Arrays

Führen Sie alle Verfahren auf einer flachen, staubfreien Oberfläche durch, um die Integrität der Proben und der Platte zu erhalten. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, verwenden Sie immer eine neue Pipettenspitze für jede Vertiefung.

Setzen Sie die QIAcuity-Nanoplatte auf das weiße Nanoplate Tray. Übertragen Sie die vorbereiteten 40 µL der PCR-Mischung in die Vertiefungen der QIAcuity Nanoplate, indem Sie die Pipette in einem 45°-Winkel halten und die Mischung auf den Boden der Vertiefung geben, ohne den Boden zu berühren. Drücken Sie die Pipette nur bis zum ersten Anschlag, um Luftblasen zu vermeiden.

Verschließen Sie das QIAcuity Nanoplate ordnungsgemäß mit den blauen Nanoplate Seals und dem QIAcuity Roller.

Setzen Sie das Nanoplate ohne das Nanoplate Tray in das Gerät.

Amplifikation und Laufparameter

Wählen Sie die verwendeten Spalten des QIAcuity Nanoplate aus und erstellen Sie eine Platemap in der QIAcuity Software Suite.

Führen Sie den Lauf unter Verwendung der Amplifikationsparameter aus Tabelle 12 durch, wählen Sie die Detektion des FAM- und HEX-Kanals

Tabelle 12 PCR-Protokoll für Mentype® DigitalQuant für den QIAcuity

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	1 x
95 °C	15 s	
61 °C	30 s	40 x

Datenanalyse

Generelle Bewertung

Öffnen Sie den abgeschlossenen Lauf im Fenster **Plates** der QIAcuity Software Suite (Qiagen GmbH). Öffnen Sie die Registerkarte **Analyze**, um die Ergebnisse unter **Absolute Quantification** anzuzeigen. Um Schwellenwerte für die Probenanalyse festzulegen, klicken Sie auf die Plattenposition des DIP Positive Control DPC. Wählen Sie alle Targets aus und klicken Sie auf **Show results**. Trennen Sie alle Cluster klar ab, indem Sie den automatischen oder einen manuellen Schwellenwert (rote Linien, siehe Abbildung 4) wählen. Wenden Sie den Schwellenwert auf alle analysierten Proben an, indem Sie sie in der Plattenansicht auswählen und die Werte für beide Fluoreszenzen einfügen.

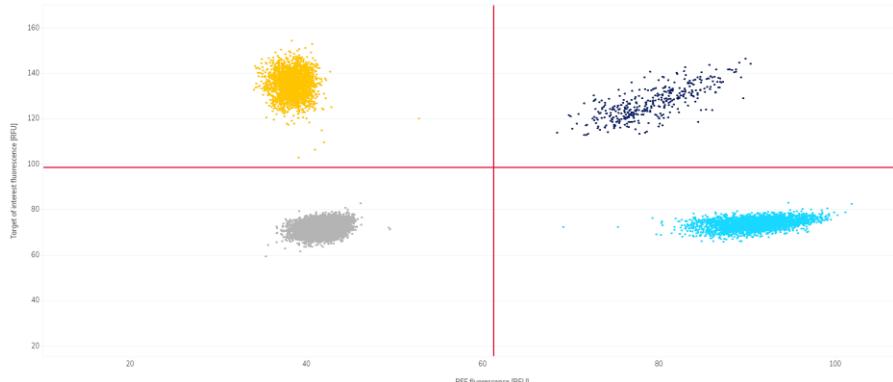


Abbildung 4 2D Amplitude (Scatter Plot) der Fluoreszenzen

Alle 4 Cluster (grau, gelb, hellblau, dunkelblau) müssen für alle Proben vollständig getrennt erscheinen (siehe [Abbildung 4](#)).

Die Ereignisse werden wie folgt interpretiert:

- doppelt negativ (grau),
- FAM positiv (gelb),
- HEX positiv (hellblau) und
- doppelt positiv (dunkelblau - positiv für FAM und HEX in derselben Kavität).

Durch Speichern der manuellen Anpassung werden die counts automatisch von der Software berechnet.

Die analysierten Daten können auf der Registerkarte **List** überprüft und heruntergeladen werden.

HINWEIS



Aufgrund von Unterschieden in den Signalamplituden wird empfohlen, auf jeder Platte eine Referenzprobe/Positivkontrolle zu analysieren, um den richtigen Schwellenwert zu ermitteln.

Mindestanforderungen an die Daten vor der Berechnung

Bevor der Anteil der Mischprobe berechnet wird, sollten die Daten auf ihre Qualität überprüft werden.

- Alle Cluster müssen entsprechend dem Amplifikationsprofil der Positivkontrolle aufgetrennt werden.
- Wenn zu viele Wells von der QIAcuity Software Suite für invalid erklärt wurden, sollten Sie eine erneute Bildgebung in Betracht ziehen (Reimaging). Um die höchste Sensitivität zu erreichen, wird empfohlen, 26k Kavitäten zu analysieren.

Berechnung der absoluten DNA-Proportionen

Berechnen Sie das Verhältnis (Konzentration (Kopien/ μ L) des DIP-Lokus (AOI) zur Referenz (REF) oder dem SRY-Lokus. Beachten Sie hierbei, ob es sich um einen homozygoten oder heterozygoten Marker handelt.

HINWEIS



Marker 307-I + REF befindet sich auf dem X-Chromosom. Dieser Marker muss in gemischgeschlechtlichen Mischproben als heterozygot behandelt werden. Die Kombination 307-I + SRY berechnen Sie wie in Tabelle 16 gezeigt.

Tabelle 13 Berechnung der DIP+Ref Kombination: homozygotes AOI

Probe	AOI	REF	Formel	Ergebnis
Post HSCT	Conc (copies/ μ L) 338	Conc (copies/ μ L) 644	= ((100 * AOI) / (REF)) = (100 * 338) / (644)	52.5 %

Tabelle 14 Berechnung der DIP+Ref Kombination: heterozygotes AOI

Probe	AOI	REF	Formel	Ergebnis
Post HSCT	Conc (copies/ μ L) 162	Conc (copies/ μ L) 611	= ((100 * 2 * AOI) / (REF)) = (100 * 2 * 162) / (611)	53 %

Tabelle 15 Berechnung der DIP+SRY Kombination: homozygotes AOI

Probe	AOI	SRY	Formel	Ergebnis
Post HSCT	Conc (copies/µL) 337	Conc (copies/µL) 182	= ((100 * AOI) / (AOI + 2 * SRY)) = (100 * 337) / (337 + 2 * 182)	48.1 %

Tabelle 16 Berechnung der DIP+SRY Kombination: heterozygotes AOI

Probe	AOI	SRY	Formel	Ergebnis
Post HSCT	Conc (copies/µL) 553	Conc (copies/µL) 506	= ((100 * AOI) / (AOI + SRY)) = (100 * 553) / (553 + 506)	52.2 %

Charakteristik und Verfügbarkeit der **Mentype® DigitalQuant Assays**

Tabelle 17 chromosomal Lokation der spezifischen Loci

Locus	Chromosomal Lokalisation	Locus	Chromosomal 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 18 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.
- Auf dem Etikett des Kits sind 25 Reaktionen angegeben. Diese Angabe basiert auf der Bio-Rad-Plattform. Die Anzahl der verwendbaren Reaktionen kann bei der Verwendung anderer digitaler PCR-Plattformen variieren.

Bestellinformation

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

Tabelle 19 Bestellinformationen zum Zubehör: 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 20 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 21 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.

Eintragene 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

RUO

Nur für wissenschaftliche Anwendungen – nicht für medizinische Diagnostik

LOT

Chargenbezeichnung



Ausreichend für <N> Tests



Hinweis auf die eIFU



Verwendbar bis



Temperaturbegrenzung

REF

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

