

A.torrentium Mikrosatelliten Protokoll, Mai 2012

Um die Multiplex-PCR Reaktionen zu machen, werden alle DNA Extraktionen am Nanodrop (F-Stock) gemessen, und anschliessend ein Aliquot mit ca. 10ng/μl hergestellt. Somit hat man mit einem μl DNA immer die optimale Menge an DNA in der PCR Reaktion (10ng)

Die Primer sind auf 50μM/L verdünnt, und bei -20°C gelagert. Alternativ kann man die Primer auf 10μM/L verdünnen.

Pipettierschema der Multiplex 1

Konz. pro Reaktionsmechanismus		Conditions:		
AP1	1.0μM	95°C	15min	
AT52	0.2μM	94°C	30s	
Aitali4	0.4μM	52°C	1min30s	
AT43	0.3μM	72°C	1min30s	35x
		60°C	30min	
		10°C	-	

-Volumen für eine PCR Reaktion mit 50μM Primerkonzentration. Da diese Volumen aber zu klein sind für die Pipette, müssen entweder mehrere Proben gemacht werden, oder der Primer wird auf 10μM anstelle von 50μM verdünnt. Für die drei Multiplex gibt es aber die Excel-Files, in welchen man einfach die Konzentration, Volumen und Anzahl Proben eingeben kann und es einem automatisch alles berechnet. Die Files sind auf der Homepage von Christophs Gruppe zu finden. Wir nehmen als Volumen für eine PCR Reaktion 11μl anstelle der üblichen 10μl. Dies, da wir so mit der Stepper und der Multichannel-Pipette arbeiten können, was die Arbeit um einiges schneller und einfacher gestaltet.

AP1	0.22μl
AT52	0.044μl
Aitali4	0.088μl
AT43	0.066μl
Mastermix	5.5μl
Wasser	4.642μl

Pipettierschema der Multiplex 2

Konz. pro Reaktionsmechanismus		Conditions:		
Aitali3	0.4μM	95°C	15min	
AT1	0.1μM	94°C	30s	
AT22	0.2μM	61°C	1min30s	
AT23	1.0μM	72°C	1min30s	35x
AP6	0.3μM	60°C	30min	
AT40	1.0μM	10°C	-	

Aitali3	0.088μl
AT1	0.022μl
AT22	0.044μl
AT23	0.22μl
AP6	0.066μl
AT40	0.22μl
Mastermix	5.5μl
Wasser	4.18μl

Für ein Sample (Primer 50μM):

Pipettierschema Duplex

Konz. pro Reaktionsmechanismus		Conditions:		
AT9	0.1µM	95°C	15min	
AT37	0.5µM	94°C	30s	
		60°C	1min30s	
		72°C	1min30s	30x
		60°C	30min	
		10°C	-	

Für ein Sample (Primer 50µM):

AT9	0.022µl
AT37	0.11µl
Mastermix	5.5µl
Wasser	5.236µl

Die PCR Reaktionen sind unter dem Namen "multiplex1-at, multiplex2-at, duplex-at" auf der PCR Maschine "Ketschup Experte" gespeichert.

Nach der PCR werden die Samples mit milliQ-Wasser verdünnt, um die Peaks auf eine auswertbare Grösse zu verkleinern. Ich verdünnte die MP1 meistens 1:5 (+40µl H₂O) und die MP2 und Duplex 1:7 (+60µl H₂O)

Anschliessend muss jeweils 1µl des Samples mit 10µl HiDi-Formamid/LIZ Size Standard 500 gemischt und mit der Multichannel- oder Stepperpipette in eine ABI Platte gegeben werden. Auf 1000µl HiDi kommen 9µl LIZ. Somit kann man auf die gewünschte Anzahl Proben umrechnen.

Genemapper

Die Farben auf dem Genemapper entsprechen folgenden Dyes:

Schwarz = ATTO 550

Grün = Yakima Yellow (YYE)

Rot = ATTO 565

Blau = FAM

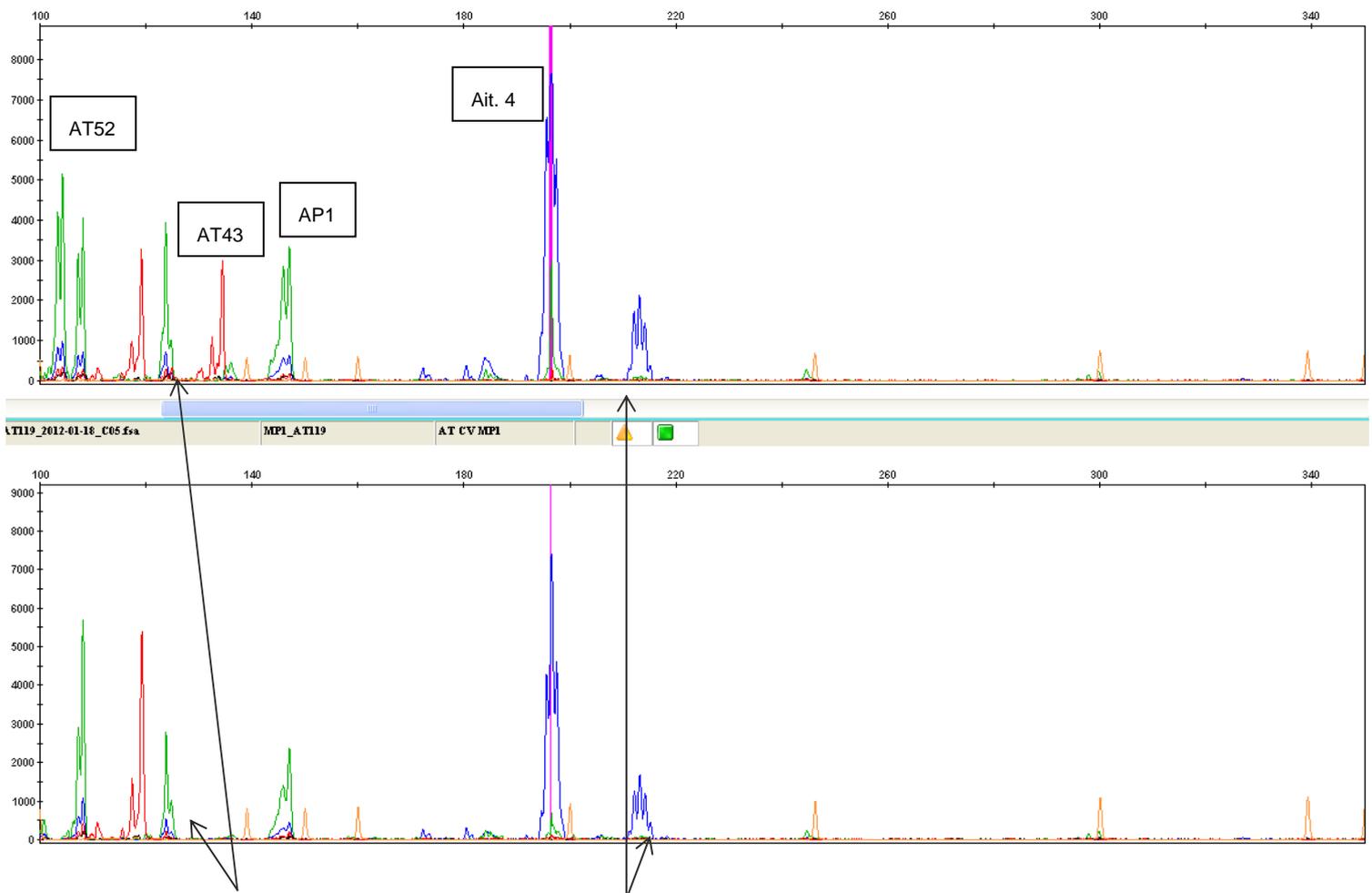
Die Farbe, die der gelieferte Primer hat, entspricht nicht der Farbe auf dem Genemapper!!

Den Genemapper-Computer starten und als Username „Genemapper“ und als PW „Microsat“ eingeben. Nun das Programm Genemapper starten und als PW erneut Microsat eingeben. Nun kann man „new project“ auswählen.

Mit dem „Add sample files“ Feld kann man seine ABI Files einlesen. Als Analysis Method „AT CV“ nehmen, und als Panel „AT CV Kit“ und dann MP1/2/3 wählen. Danach noch den Size Standard „GSLIZ500 3130“ wählen. Nun kann man die Proben analysieren und danach unter „Genotypes“ und nach Marker sortiert die einzelnen Allele bearbeiten.

Screenshots von zwei Proben der jeweiligen Multiplex-Reaktionen

Multiplex 1, Peak Muster:

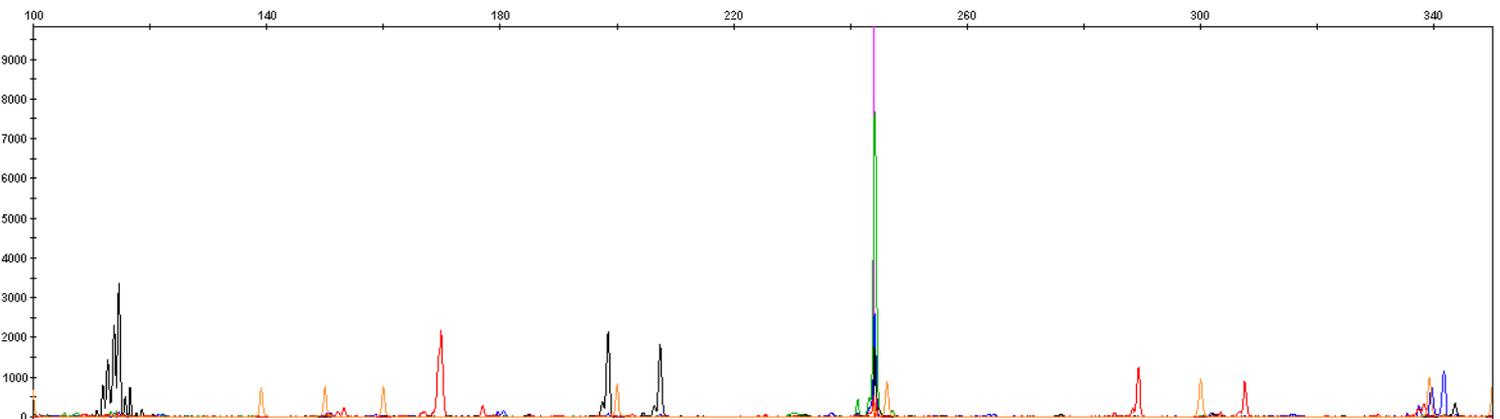
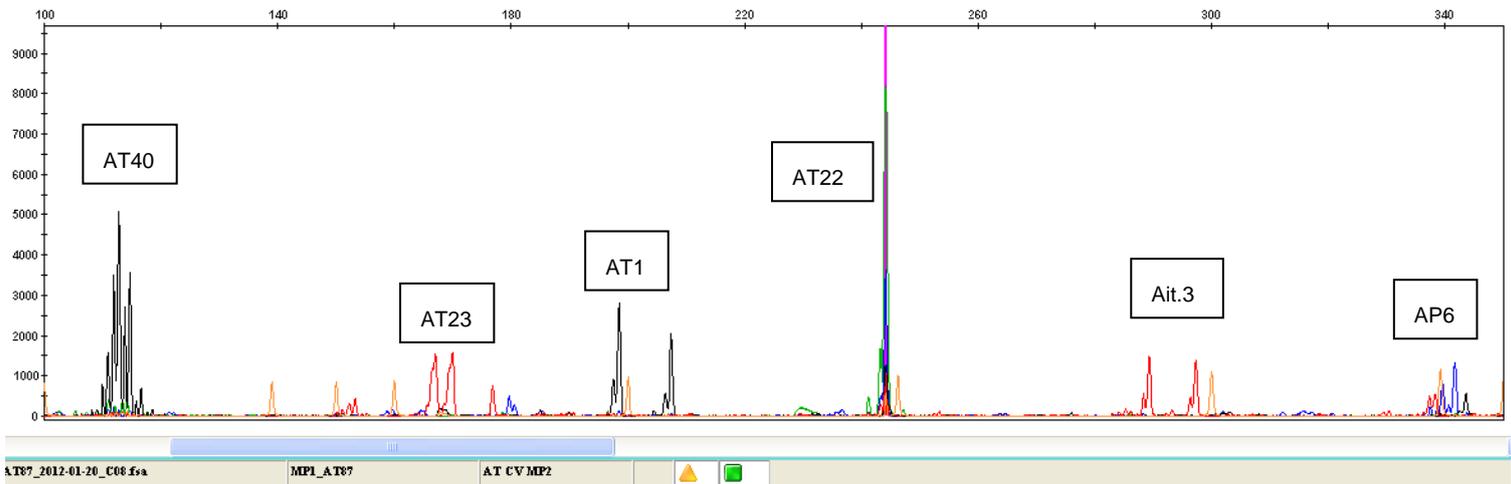


Grüner Junk Peak bei ca. 122bp!, der in fast allen Proben vorkommt.
Auch der blaue Igel-Peak hinter Aitali4 ist ein Artefakt.

Alle bekannten Allele:

AP1 (grün): 145,147
AT52 (grün): 104,108
Aitali4 (blau): 196
AT43 (rot) : 119,134

Multiplex 2, Peak Muster:



Alle bekannten Allele:

Aitali3 (rot): 249,289,293,298,304,308

AT1 (schwarz): 198,207,210

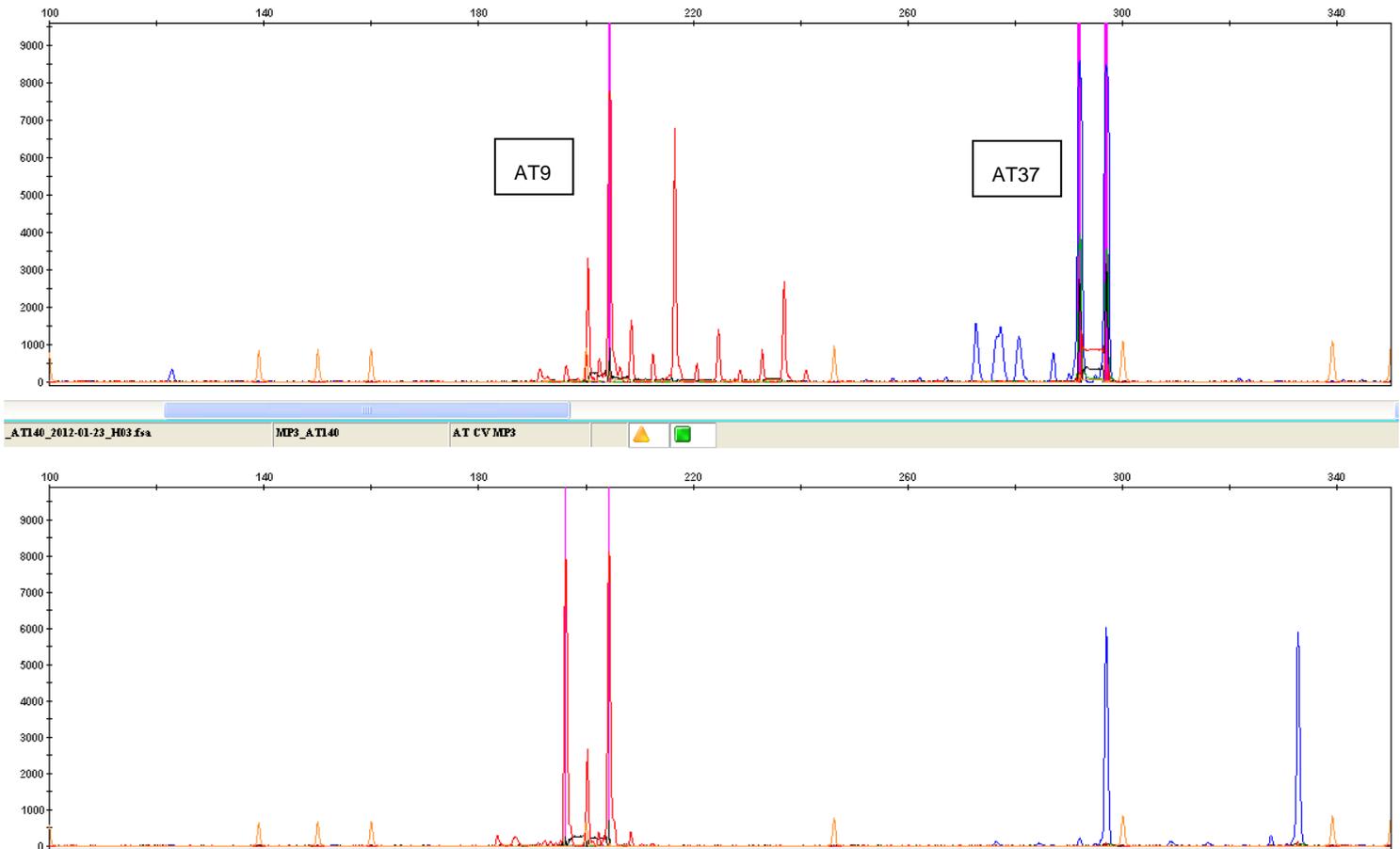
AT22 (grün, hier homozygot): 241,244

AT23 (rot): 154,166,169

AP6 (blau): 342

AT40 (Schwarz): 113,115. Etwas schwierig zu scoren, da er trotz Pigtail immer noch viele Stotter aufweist. Oben liegt er heterozygot und unten homozygot vor.

Duplex, Peak Muster:



Alle bekannten Allele:

AT9 (rot): 204,217

AT37 (blau): 287,292,297,323,328,333,338

Oben sehen wir beim AT9 die vermutete Genduplikation. Der Peak ganz links bei der unteren Probe ist bei 196bp. Wir ignorieren ihn, jedoch ist er wohl mit dem kleinen Peak bei 200bp eine Genduplikation der 204/217 Allele. Für uns sind jedoch nur die 204/217 Allele relevant.