Methodenvergleich:
Mentype® Nonaplex I PCR Amplification Kit vs. GenePrint® 24 System

Marina Valentina Affolter, BMA 21-24

Biomedizinische Analytik HF

Clinical Genomics Lab, Inselspital Bern, Molekularpathologie

1. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Mentype® Nonaplex I PCR Amplification Kit (Nonaplex Kit) und das GenePrint® 24 System Kit (GenePrint Kit) miteinander zu vergleichen. Dabei handelt es sich bei beiden Kits um eine Fragmentanalyse von Short Tandem Repeats (STR). Eingesetzt werden DNA mit verschiedenen Fragmentlängen, die aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebetteten Gewebe (FFPE) extrahiert wurde. Die Resultate zeigen, dass das Nonaplex Kit dem GenePrint Kit bei einer DNA-Qualität von 100 bp, 200 bp und 300 bp überlegen ist.

2. Einleitung

Das Clinical Genomics Lab (CGL) benutzt bis anhin das Nonaplex Kit und bezieht einen Wechsel auf das GenePrint Kit für die Analyse von Short Tandem Repeats (STRs) bei Blasenmolen und Identitäts-nachweisen in Betracht. Bei der Blasenmole handelt es sich um eine Erkrankung des kindlichen Gewebes während einer Schwangerschaft[1]. Das Nonaplex Kit amplifiziert nur 8 STRs, wobei bei der Analyse von DNA aus FFPE-Material die DNA oft stark fragmentiert ist und nicht alle STRs interpretierbar sind[2]. Das GenePrint Kit analysiert hingegen 22 STRs und es wird erwartet, dass bei schlechter Qualität dieses Kit aufgrund der grösseren Zahl an untersuchten STRs überlegen ist[3].

Short Tandem Repeat auch Mikrosatelliten genannt, bestehen aus einer repetitiven DNA-Sequenz, bei der identische Nukleotid-sequenzen direkt aufeinanderfolgen[4,5,6]. Die STR weisen eine hohe Mutationsrate auf, die zu vielen Kombinationen führen, welche mit einer hohen Spezifität einem Individuum zugeordnet werden können[6,7].

3. Ziele und Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Nonaplex Kit und das GenePrint Kit miteinander zu vergleichen.

Kann das GenePrint Kit eine DNA, die stark fragmentiert ist, eindeutiger diagnostizieren als das Nonaplex Kit?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Zur Ermittlung des minimalen DNA-Fragmentierungsgrad werden aus der Datenbank Proben mit bekannter DNA-Qualität herausgesucht. Die Qualität wurde während der Routinediagnostik mit dem Biomed-Mix ermittelt, der Sequenzen von 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp aus unterschiedlichen house-keeping Genen amplifiziert. Für jede Fragmentlänge werden zwei Fälle sowohl mit dem GenePrint Kit wie auch mit dem Nonaplex Kit analysiert.

Die DNA wurde mit einer Stanze oder mittels 10 µm dicken Röllchen aus einem FFPE-Block gewonnen. Die Extraktion wurde vorgängig mit dem Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit auf dem Maxwell® RSC48 durchgeführt. Anschliessend werden die PCR mit dem GenePrint Kit wie auch mit dem Nonaplex Kit durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Fragmentanlyse mittels PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern. Die PCR-Produkte werden durch die Kapillarelektrophorese mit dem Genetic Analyser 3500/3500xL aufgetrennt und mithilfe eines Längenstandards analysiert[6].

5. Ergebnisse

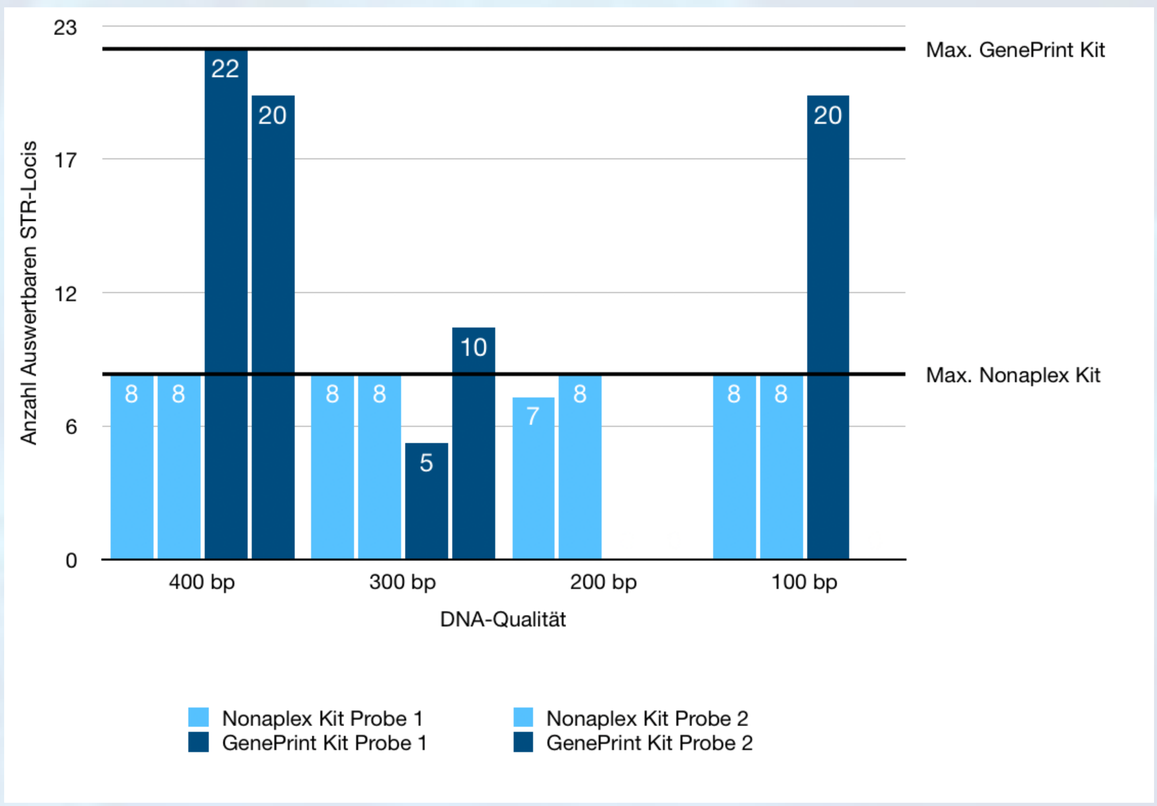


Abbildung 1: Resultate minimaler DNA-Fragmentierungsgrad Nonaplex Kit und GenePrint Kit (Affolter, 2024)

6. Diskussion

Das Nonaplex Kit liefert über alle DNA-Qualitäten sehr gute Resultate. Nur bei einer DNA mit der Qualität von 200 bp, kann ein Marker nicht interpretiert werden.

Bereits bei einer DNA-Qualität von 400 bp können beim GenePrint Kit bei einem Fall 2 STR-Loci nicht ausgewertet werden. Bei 300 bp können beim GenePrint Kit nur noch die Hälfte respektive ein Viertel der STR-Loci ausgewertet werden, da die restlichen Allele eine zu geringe oder gar keine Intensität aufweisen. Bei 200 bp funktionieren diese bei beiden nicht mehr, die eine Versuchsprobe weist zu geringe Intensitäten auf und die andere einen unspezifischen Peak bei ca. 140 bp. Die Resultate bei einer Qualität von 100 bp sind beim GenePrint Kit unerwartet. Bei einem Fall ist ein unspezifischer Peak bei ca. 140 bp vorhanden und bei der anderen DNA funktionierten 20 Marker, da vorwiegend Fragmente einer Länge von 100 bp vorhanden sind, jedoch auch einzelne mit bis zu 400 bp.

Abschliessend kann gesagt werden, dass das GenePrint Kit dem Nonaplex Kit bei einer sehr guten Qualität von 400 bp deutlich überlegen ist, jedoch ist das Nonaplex Kit bei schlechterer DNA-Qualität besser.

Referenzen

[1]Goerke, K. (2022, August). *Blasenmole*. Pschyrembel Online. https://www.pschyrembel.de/blasenmole/K03U1/doc/

[2]Biotype GmbH. (2023a). *Mentype® Nonaplex I PCR Amplification Kit, Gebrauchsanweisung*. https://www.biotype.de/fileadmin/user/IFU/Gebrauchsanweisung-Mentype-Nonaplex-QS-NONAIFU02v2de.pdf

[3] Promega. (2020). *GenePrint® 24 System, Technical Manual*. https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm465-geneprint-24-system.pdf

[4] Hansjosef Böhles (Hrsg.). (2016). *Stoffwechselerkrankungen im Kindes- und Jugendalter* (1. Aufl.). Thieme.

[5] Märkl, B. (2018). Mikrosatellitenstatus und Mismatch-Reparatur-System. In Helmut Messmann, Andrea Tannapfel, & Jens Ulrich Werner (Hrsg.), *Gastrointestinale Onkologie* (1. Aufl., S. 280). Thieme Verlag KG. https://doi.org/10.1055/b-005-143320

[6] Schneider, P. M., & Vennemann, M. (2023). Forensische Molekulargenetik. In B. Madea (Hrsg.), *Rechtsmedizin: Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung* (S. 1019–1071). Springer.

[7] Raz, O., Biezuner, T., Spiro, A., Amir, S., Milo, L., Titelman, A., Onn, A., Chapal-Ilani, N., Tao, L., Marx, T., Feige, U., & Shapiro, E. (2019). Short tandem repeat stutter model inferred from direct measurement of in vitro stutter noise. *Nucleic Acids Research*, *47*(5), 2436–2445. https://doi.org/10.1093/nar/gky1318

Abbildung:

Abb. 1 Affolter, M. (2024). Resultate minimaler DNA-Fragmentierungsgrad Nonaplex Kit und GenePrint Kit. medi.