



DC8902和DC8942产品使用说明

PowerPlex[®] 21 系统



www.promega.com

原英文版操作手册TMD034

PowerPlex® 21 系统

(中文译文仅供参考, 如有出入请以英文版本为准)



所有的技术文献可从公司网站<http://www.promega.com/protocols/>得到。
请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本。
如果您在本产品的使用过程中遇到任何问题, 请与Promega技术服务部门联系。
邮箱: genetic@promega.com

1. 介绍.....	2
2. 产品组份及存储条件.....	3
3. 实验前必读.....	4
A. 警示.....	4
B. Matrix生成或光谱校正.....	5
4. 使用PowerPlex® 21系统进行DNA扩增的程序.....	5
A. DNA提取液的扩增.....	5
B. 对储存卡上的DNA进行直接扩增.....	7
C. 对棉签上的DNA进行直接扩增.....	10
5. 仪器设置及样品准备.....	13
A. 使用Applied Biosystems 3500或3500xL型遗传分析仪检测扩增片段.....	13
B. 使用ABI PRISM® 3100或3100-Avant型遗传分析仪, Version 2.0版本数据收集软件, 或使用Applied Biosystems 3130 或3130xl 型遗传分析仪, Version 3.0版本数据收集软件, 检测扩增片段.....	20
6. 数据分析.....	22
A. GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中PowerPlex® 21系统 Panels, Bins和Stutter的 设置.....	22
B. 用GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)创建标准片段.....	23
C. 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中导入WEN_ILS_500_IDX标准片段.....	24
D. 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中创建案件样本的分析方法.....	24
E. 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中创建数据库或亲子鉴定的分析方法.....	27
F. GeneMapper® ID软件(3.2版本)PowerPlex® 21 Panels和Bins的设置.....	30
G. GeneMapper® ID (3.2)创建标准片段.....	30
H. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中导入WEN_ILS500标准片段.....	32
I. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中创建案件样本的分析方法.....	32
J. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中创建数据库或亲子鉴定的分析方法.....	34
K. 对照.....	36
L. 结果.....	36
7. 问题及解决方案.....	38
A. 扩增及片段分析.....	38

B. 对的DNA采集卡的直接扩增.....	41
C. 对棉签上的DNA的直接扩增.....	43
D. GeneMapper® ID-X分析软件.....	44
E. GeneMapper® ID分析软件.....	46
8. 参考文献.....	49
9. 附录.....	51
A. 使用PowerPlex® 21系统的位点优势.....	51
B. DNA的提取及定量方法及自动化操作.....	54
C. The WEN Internal Lane Standard 500.....	54
D. 缓冲液及试剂的组份.....	55
E. 相关的产品.....	56

1. 介绍

STR位点(短串连重复序列)是由长度为3-7个碱基对的短串连重复序列组成(1-4)。这些重复序列广泛的存在于人类基因组中,是高度多态性标记的丰富来源(5-9)。并可以通过聚合酶链反应来检测这些位点。扩增区域内重复序列的重复次数不同导致STR位点的等位基因分型差异,在电泳分离后,通过荧光检测可区分不同的基因型。

PowerPlex® 21系统^(a-b)可应用于法医学分析、亲缘关系检测以及科研等人类遗传鉴定方面。该系统可以进行21个基因座(20个STR位点和1个性别位点)的复合扩增,并用4色荧光进行检测。系统内的基因座包括D1S1656、D2S1338、D3S1358、D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、Amelogenin、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX和vWA。

PowerPlex® 21系统可在ABI PRISM® 3100和3100-Avant型遗传分析仪以及Applied Biosystems 3130、3130xl、3500和3500 xL型遗传分析仪上进行电泳分析。由于扩增及检测仪器的差异,各个实验室需要根据自己仪器的情况对循环参数和进样时间等进行调整优化。此外,还需进行实验室有效性验证。

PowerPlex® 21系统提供了基因组DNA扩增所需的全部试剂,包括热启动DNA聚合酶,其包含在PowerPlex® 21 5X Master Mix溶液中。本操作手册同时提供了使用GeneAmp® PCR System 9700型热循环仪扩增PowerPlex® 21系统的程序,以及扩增产物分离、检测的操作流程(图1所示)。荧光检测仪器的操作说明可以从仪器制造商处获取。

如需了解Promega公司其他荧光STR系统的信息,请与Promega公司联系或登陆网站: www.promega.com。

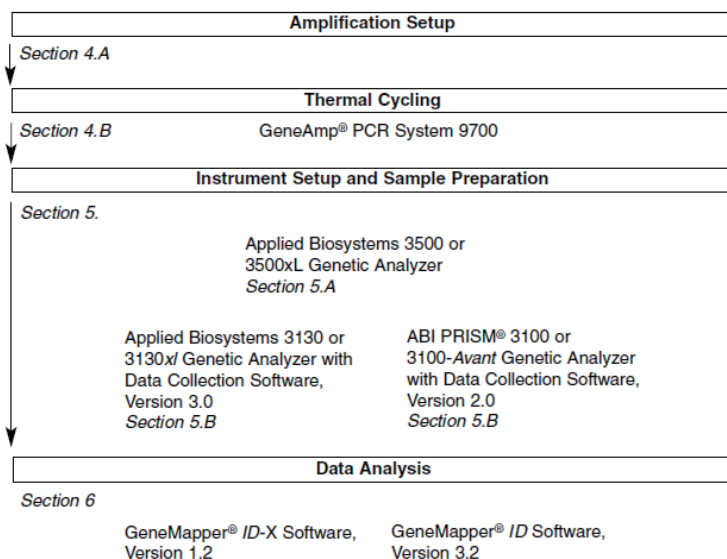


图1. PowerPlex® 21系统操作流程概览

2. 产品组份和储存条件

产品	规格	目录号
PowerPlex® 21系统	200人份	DC8902
PowerPlex® 21系统	4 × 200人份	DC8942

此产品不得用于医疗诊断。DC8902提供的试剂，足以以25µl反应体系进行200次反应，DC8942提供的试剂，足以以25µl反应体系进行800次反应200人份的试剂盒包括：

扩增前试剂盒组份(蓝色管盖)

1ml	PowerPlex® 21 5X Master Mix
1ml	PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix
25µl	2800M Control DNA, 10ng/µl
5 × 1,250µl	Water, Amplification Grade

扩增后试剂盒组份(米黄色管盖)

100µl	PowerPlex® 21 Allelic Ladder Mix
200µl	WEN ILS500

① PowerPlex® 21系统的等位基因Ladder在运输过程中保存于隔离、密闭包装中。包装开启后应置于“扩增后”的盒中。扩增用水(Water, Amplification Grade)在运输过程中也保存于隔离、密闭包装中。包装开启后应置于“扩增前”的盒中。

储存条件：如需长时间储存，除2800M Control DNA外，所有组份均要求保存

于-30℃~-10℃非自动除霜冷冻柜。可将2800M Control DNA 保存于2℃~10℃环境中。在日常使用中，PowerPlex® 21系统各组份可在4℃的条件下保存一星期。PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix, PowerPlex® 21 Allelic Ladder Mix以及WEN ILS500对光敏感，须避光保存。我们强烈推荐扩增前试剂与扩增后试剂要分开保存，并使用不同的吸头，试管架等。

单独提供的产品：

GeneMapper® ID和ID-X软件相应的panels和bins文件可从下面的网址下载：www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/

Matrix standard用于初始建立色谱分离矩阵文件。可以针对不同的分析型号单独购买，包括ABI PRISM® 3100、3100-Avant型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130、3130x1、3500以及3500xL型遗传分析仪(PowerPlex 5C Matrix Standard, 目录号DG4850)。

3. 实验前必读

3.A. 警示

此手册中未包含法庭及侵权案件中基于PCR的基因分型的应用需要有效性的研究及质量控制措施(10, 11)。在*Internal Validation of STR Systems*中有鉴定过程的准则(12)。

纯化DNA的质量、缓冲液的微小差异、离子强度、引物浓度，热循环仪的选择及热循环条件等都可能影响PCR反应的成功与否，因此我们建议客户严格遵照操作手册推荐的实验程序进行扩增和荧光检测。如果客户对推荐的流程进行任何修改，有必要进行进一步的研究及认证。

基于PCR的STR分析技术易受微量人类DNA的污染。当制备样品DNA、处理引物对、进行扩增反应及分析扩增产物时，都要格外小心以避免交叉污染。扩增前使用的试剂和原料(PowerPlex® 21 5X Master Mix, PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix, 2800M Control DNA和Water, Amplification Grade)应存放于一个单独的盒子中，并且要与扩增后使用的试剂和原料(PowerPlex® 21 Allelic Ladder Mix和WEN ILS500)分开保存。每次反应须设立阴性对照反应(如，无模板的扩增)来监测试剂是否存在污染。我们强烈推荐使用手套及防回吸加样头(如ART® tips, 参见章节9.F)。

一些用于STR产物分析的试剂含有潜在的毒性作用，应按照要求操作。甲酰胺是一种有刺激性和致畸毒性的试剂，应避免吸入以及接触皮肤。在使用这些试剂之前请阅读警示标签，并采取相应的防护措施。使用甲酰胺时请务必戴上手套和防护眼镜。

3. B. Matrix生成或光谱校正

在ABI PRISM®3100和3100-Avant型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130、3130xl、3500和3500xL型遗传分析仪上生成正确的Matrix文件，对评估多色荧光系统是至关重要的。并且，每台仪器都要有自己的Matrix文件。

有关光谱校正的操作流程及进一步的信息，可以参阅PowerPlex 5C Matrix Standard,技术手册(TMD049)。手册可登陆网站www.promega.com/protocols/获得。

4. 使用PowerPlex® 21系统进行DNA扩增的程序

我们在GeneAmp® PCR System 9700 热循环仪上对PowerPlex® 21系统的扩增程序进行了优化。

为了防止交叉污染，强烈建议在实验过程中使用手套及防回吸枪头。须将扩增前试剂与扩增后试剂放在不同的实验室，在专门的实验室内配置扩增反应液，在专门的仪器设备上进行扩增反应。



为确保扩增成功，扩增时需特别小心。我们在章节7提供了扩增过程中可能遇见的问题及解决方案。

通过检测260nm的紫外吸收峰得到2800M Control DNA的浓度，如通过其他方法定量此对照DNA，如qPCR，可能得到不同的数值。请在每次扩增时都重新稀释对照DNA，请不要储存稀释的DNA(如0.25ng/μl或更低的浓度)。

4.A. DNA提取液的扩增

需用户准备的材料

- GeneAmp® PCR System 9700型热循环仪 (Applied Biosystems)
- 微量离心机
- MicroAmp® 透光96孔反应板或0.2mlMicroAmp® 反应管(Applied Biosystems), 或其他品牌的相应产品
- 防回吸加样枪头(参见章节9.F)

根据以下的操作流程，我们通常推荐25μl反应体积中加入0.5ng的模板DNA。

扩增设置

1. 充分融化PowerPlex® 21 5X Master Mix, PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix和扩增用水(Water, Amplification Grade)。

注意:使用前将试剂轻微离心确保各组分沉到管底，然后漩涡振荡15s以充分混匀。在漩涡振荡后不要再对5X Master Mix及5X Primer Pair Mix混液进行离心，以免试剂高浓度成分的集中于管底。

2. 确定扩增反应的数目，包括阳性及阴性对照。增加1-2个反应以消除移液误差。这个步骤也许会浪费少量试剂，但可确保所有的样品都有足够的PCR反应液，也可保证每一个反应管中有相同的PCR反应液。

3. 使用干净的0.2ml MicroAmp[®]反应板并正确标记, 进行批量扩增, 或者根据反应的数目, 使用干净的0.2ml的反应管, 并对其正确标记。
4. 将各反应组分的终体积(表1所示)加至1.5ml无菌离心管中。

表1显示了每个反应体系中的组份组成。在章节9.D(表7)中我们提供了PCR反应液中每种组份用量的计算表。

表1. PowerPlex[®] 21系统扩增混合液(扩增提取DNA)

PCR反应混合液组份 ¹	每份样本所加体积
扩增用水(Water, Amplification Grade)	加至终体积25 μ l
PowerPlex [®] 21 5X Master Mix	5.0 μ l
PowerPlex [®] 21 5X Primer Pair Mix	5.0 μ l
模板DNA(0.5ng) ^{2,3}	最多加至15 μ l
反应总体积	25 μ l

¹首先向离心管中加入扩增用水(Water, Amplification Grade), 然后依次加入PowerPlex[®] 21 5X Master Mix、PowerPlex[®] 21 5X Primer Pair Mix。在步骤6中加入DNA模板。

²DNA模板要储存在去核酸酶纯净水或TE⁻缓冲液中(10mM Tris-HCL [PH=8.0], 0.1mM EDTA)。如果储存DNA模板的TE⁻缓冲液PH值不是8.0, 或者EDTA浓度过高, 则DNA模板溶液的加入体积不应超过PCR反应液总体积的20%。PCR扩增效率与扩增质量会受到PH值变化(与Tris-HCL的量有关)、有效Mg²⁺的浓度(与EDTA的螯合作用有关)或其他PCR抑制物的影响, 抑制物成分的浓度或许很低, 这取决于DNA模板的质量及提取方法。

³DNA模板的浓度取决于DNA的定量方法(13)。本手册推荐的DNA模板用量, 是根据在260nm的紫外吸收峰值测定的DNA浓度而得到的。我们强烈建议用户在进行实验操作时, 使用用户实验室的DNA的定量方法决定最优的DNA浓度。

5. 漩涡震荡PCR扩增混合液5-10秒, 然后将PCR混合液分装至每个反应管中。
注意: 如果未将PCR扩增混合液充分混匀, 可能会导致扩增产量降低或位点之间的不平衡。
6. 向含有PCR扩增混合液的反应管中加入相应样本的模板DNA(0.5ng)。
7. 设置扩增的阳性对照。稀释2800M Control DNA, 使其在加入与样本同样的体积中含有0.5ng DNA。将稀释后含有0.5ng DNA的2800M加入到相应的装有PCR反应液的反应管中。
8. 设置扩增的阴性对照。将扩增用水(Water, Amplification Grade)代替模板DNA, 加入到含有PCR扩增液的反应管中。
9. 盖紧反应板或管。也可将反应板轻微离心, 将反应液离心到反应管的底部, 并消除气泡。

扩增循环参数设置

由于不同实验室的扩增及检测仪器的灵敏度不尽相同，需要针对各自实验室仪器的性能优化实验条件，包括循环数及电泳进样时间等。Promega公司的测试结果显示：纯化后的DNA模板为0.5ng时，30个循环可得到良好的扩增效果。

1. 将MicroAmp[®]反应板或反应管置于热循环仪中。
2. 选择并运行推荐的循环程序。下面提供了使用GeneAmp[®] PCR System 9700热循环仪进行扩增的操作程序。

整个循环时间预计在1.5小时。

热循环程序¹

96°C for 1 minute, then:

94°C for 10 seconds

59°C for 1 minute

72°C for 30 seconds

for 30 cycles, then:

60°C for 10 minutes

4°C保存

¹当使用GeneAmp[®] PCR system 9700热循环仪时，程序必须在最大温度变化速率下运行(这需要一个银或金镀银的热模块板)。热循环开始运行后可对温度变化速率进行设置。选择“Method”进入设置选项屏幕。选择“MAX mode”作为速率设置模式，然后输入反应终体积。

3. 热循环程序结束后，将扩增的产物保存在-20°C避光环境中。

注意：将扩增样品长时间地保存在4°C或更高温度的环境中，可能会使产物降解。

4.B 对储存卡上的DNA进行直接扩增

需用户准备的材料

- GeneAmp[®] PCR System 9700型热循环仪(Applied Biosystems)
- 微量离心机
- MicroAmp[®]透光96孔反应板或0.2ml MicroAmp[®]反应管(Applied Biosystems), 或其他品牌的相应产品
- 防回吸加样枪头(参见章节9.F)
- 用于非FTA卡的PunchSolution™ Kit (目录号DC9271)
- 1.2mm Harris微型打孔器或其他品牌的相应手动打孔装置，打孔垫片

本章节包含了使用PowerPlex[®] 21系统和GeneAmp[®] PCR System 9700型热循环仪对储存卡片上的DNA进行直接扩增的程序。

注意：各自实验室需要对每个反应所需的卡片数量进行优化和认证。

基于FTA®卡的样本类型包括：

- 使用Whatman EasiCollect™或Fitzco Sampact™装置收集在FTA®卡上的口腔上皮细胞(25µl扩增反应液中加入1或2片打孔样本)。
- 使用无菌棉签收集的口腔上皮细胞，然后转移至FTA®卡或指示型FTA®卡上(25µl扩增反应液中加入1或2片打孔样本)。
- FTA®卡血斑(收集于Vacutainer®试管的血样或直接采自指尖血)(25µl扩增反应液中加入1片打孔样本)。

非FTA®卡的样本类型包括：

- Bode Buccal DNA Collector™装置收集的口腔上皮样品(25µl扩增反应液中加入1片打孔样本)
- 非FTA®卡片类型上的血液或口腔上皮样品(例如，S&S 903) 25µl扩增反应液中加入1片打孔样本)

在加入PCR扩增混合液之前，应使用PunchSolution™ Kit (目录号DC9271) 预处理并裂解非FTA卡样本。欲知更多信息，请参照PunchSolution™ Kit的操作说明TMD038预处理样本可能收集图谱不完整。

使用手动打孔工具取一片1.2mm直径卡片样品，请从靠近样本中央取样。推进打孔装置后部的活塞，将卡片放入反应板的相应孔内。

取样也可使用自动打孔机，如使用自动打孔机进行1.2mm样品取样，请仔细阅读仪器的用户指南、技术建议及疑难解答部分。

注意：将样品放进孔里时可能会遇到静电效应，可将PCR扩增混合液预先加入到孔里，这样可能会对减少静电效应有所帮助。

扩增设置

1. 充分融化PowerPlex® 21 5X Master Mix, PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix和扩增用水(Water, Amplification Grade)。

注意：使用前将试剂轻微离心确保各组分沉到管底，然后漩涡振荡15s以充分混匀。在漩涡振荡后不要再对5X Master Mix及5X Primer Pair Mix混液进行离心，以免试剂高浓度成分的集中于管底。

2. 确定扩增反应的数目，包括阳性及阴性对照。增加1-2个反应以消除移液误差。这个步骤也许会浪费少量试剂，但可确保所有的样品都有足够的PCR反应液，也可保证每一个反应管中有相同的PCR反应液。
3. 使用干净的0.2ml MicroAmp®反应板并正确标记。
4. 将各反应组分的终体积(表2所示)加至无菌离心管中。

表2. PowerPlex® 21系统扩增混合液(DNA卡的直接扩增)

PCR反应混合液组分 ¹	每份样本所加体积	X	反应数目	=	终体积
扩增用水 (Water, Amplification Grade)	15µl		X	=	
PowerPlex® 21 5X Master Mix	5.0µl		X	=	
PowerPlex® 21 5 X Primer Pair Mix	5.0µl		X	=	
反应总体积	25µl		X	=	

¹首先向离心管中加入扩增用水(Water, Amplification Grade), 然后依次加入PowerPlex® 21 5X Master Mix、PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix。在步骤6中加入FTA卡或者DNA模板。

5. 漩涡震荡PCR扩增混合液5-10s, 然后将25µl PCR混合液分装至每个反应管中。如果未将PCR扩增混合液充分混匀, 可能会导致扩增产量降低或位点之间的不平衡。



注意: 对于非FTA卡而言, 应将PCR扩增液加入到预处理的卡片中。对于FTA卡打孔样本而言, 在步骤6中加入DNA储存卡片。或者, 也可先加DNA储存卡片, 然后再加PCR反应混合液。

6. 将1-2片1.2mm直径的含有口腔上皮样本的卡片、或者1片1.2mm直径的含有全血样本的卡片加入到扩增板相应的孔中。
7. 设置扩增的阳性对照。将1µl 2800M Control DNA加入到相应的装有25µl PCR反应液的反应管中。

注意:

1. 不要将空白的卡片样本加入到阳性对照中。
2. 根据循环条件和试验参数, 有必要对阳性对照DNA的加入量进行优化。
8. 预留一个装有PCR反应混合液的孔作为阴性对照。使用一片空白的卡片作为阴性对照, 来监测样品卡或打孔装置是否存在污染。
9. 低速离心反应板, 使样品卡沉到管底。

扩增循环参数设置

由于不同实验室的扩增及检测仪器的灵敏度不尽相同, 需要针对各自实验室仪器的性能优化实验条件, 包括循环数(24-27个循环)及电泳进样时间等。Promega公司的测试结果显示: 针对大部分的样本类型, 25个循环可得到良好的扩增效果。口腔样本比血卡样本需要更多的循环数。循环数应针对每个实验室的每个扩增样品类型进行优化。

1. 将MicroAmp®反应板置于热循环仪中。

2. 选择并运行推荐的循环程序。下面提供了使用GeneAmp® PCR System 9700热循环仪进行扩增的操作程序。

整个循环时间预计在1.5小时。

热循环程序¹

96°C for 1 minute, then:

94°C for 10 seconds

59°C for 1 minute

72°C for 30 seconds

for 25 cycles, then:

60°C for 20 minutes

4°C 保存

¹当使用GeneAmp® PCR system 9700热循环仪时，程序必须在最大温度变化速率下运行(这需要一个银或金镀银的热模板)。热循环开始运行后可对温度变化速率进行设置。选择“Method”进入设置选项屏幕。选择“MAX mode”作为速率设置模式，然后输入反应终体积。

3. 热循环程序结束后，将扩增的产物保存在-20°C避光环境中。

注意：将扩增样品长时间地保存在4°C或更高温度的环境中，可能会使产物降解。

PCR优化

应根据初始预实验的结果对循环次数进行优化，从而确定收集方法、样本类型、样本卡片数目以及仪器等各方面的灵敏性。

1. 选择几种本实验室经常用到的典型样品，按照常规的试验流程进行预处理。
2. 按照您首选的设计方案，将1-2片包含口腔样本或1片包含全血样本的1.2mm直径的卡片放进反应板的每一个孔里。
3. 准备4个装有同样卡片样本的反应板。
4. 按照上面推荐的热循环程序进行扩增，但将每一个反应板设置不同的循环次数(24-27个循环)
5. 得到扩增数据之后，应用本实验室经过验证的提取及检测方案，确定每个样本类型的最优的循环次数及卡片数目。

4.C. 对棉签上的DNA进行直接扩增

需用户准备的材料

- GeneAmp® PCR System 9700型热循环仪 (Applied Biosystems)
- 微量离心机
- MicroAmp® 透光96孔反应板或0.2ml MicroAmp® 反应管 (Applied Biosystems)，或其他品牌的相应产品

- 防回吸加样枪头(参见章节9.F)
- SwabSolution™试剂盒, 定制产品(目录号, DC8271)

本章节包含了使用PowerPlex® 21系统和GeneAmp® PCR System 9700型热循环仪对棉签上DNA的提取液进行扩增的程序。

依照SwabSolution™ Kit操作手册TMD037所示使用SwabSolution™ Kit (目录号: DC8271)预处理棉签或OmniSwab™ (GE Healthcare), 获得棉签预处理液。确保处理样本时, 将一个空白的棉签作为阴性对照。

样品准备:

使用SwabSolution™试剂盒, (目录号, DC8271), 对棉签或OmniSwabs™ (GE Healthcare)进行预处理。如需更多信息, 请参照SwabSolution™试剂盒技术手册TMD037。

扩增设置:

1. 充分融化PowerPlex® 21 5X Master Mix, PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix和扩增用水(Water, Amplification Grade)。

注意:使用前将试剂轻微离心确保各组分沉到管底, 然后漩涡振荡15s以充分混匀。在漩涡振荡后不要再对5X Master Mix及5X Primer Pair Mix混液进行离心, 以免试剂高浓度成分的集中于管底。
2. 确定扩增反应的数目, 包括阳性及阴性对照。增加1-2个反应以消除移液误差。这个步骤也许会浪费少量试剂, 但可确保所有的样品都有足够的PCR反应液, 也可保证每一个反应管中有相同的PCR反应液。
3. 使用干净的0.2ml MicroAmp®反应板并正确标记, 使用干净的反应管, 并对其正确标记。
4. 将各反应组分的终体积(表3所示)加至无菌离心管中。

表3. PowerPlex® 21系统扩增混合液(棉签上DNA的直接扩增)

PCR反应混合液组分 ¹	每份样本所加体积	X	反应数目	=	终体积
扩增用水 (Water, Amplification Grade)	13µl				
PowerPlex® 21 5X Master Mix	5.0µl				
PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix	5.0µl				
棉签上DNA的提取液	2.0µl				
反应总体积	25µl				

¹首先向离心管中加入扩增用水(Water, Amplification Grade), 然后依次加入PowerPlex® 21 5X Master Mix、PowerPlex® 21 5X Primer Pair Mix。在步骤6中加入棉签上DNA的提取液。

5. 漩涡震荡PCR扩增混合液5-10s, 然后将23 μ l PCR混合液分装至每个反应管中。
注意: 如果未将PCR扩增混合液充分混匀, 可能会导致扩增产量降低或位点之间的不平衡。

6. 将棉签上DNA提取液加入到扩增板相应的孔中。

7. 设置扩增的阳性对照。将2800M Control DNA稀释到5.0ng/ μ l, 然后加2 μ l到相应的装有23 μ l PCR反应液的反应管中。

注意: 如需保存稀释的2800M Control DNA, 可用含有20 μ g/ml糖原的TE⁻⁴缓冲液将DNA稀释至5.0ng/ μ l。请勿留存用水稀释的DNA。

8. 设置扩增的阴性对照。将扩增用水(Water, Amplification Grade)代替棉签DNA提取液, 加入到含有PCR扩增液的反应管中。

注意: 应加入一个阴性对照。应向扩增反应液中加入处理空棉签获得的预处理液, 或者将SwabSolution™或PunchSolution™组份作为空白加入到扩增反应液中。

9. 密封反应板。或者轻微将反应板离心, 保证反应溶液位于反应孔的底部, 并去除气泡。

扩增循环参数设置

由于不同实验室的扩增及检测仪器的灵敏度不尽相同, 需要针对各自实验室仪器的性能优化实验条件, 包括循环数(24-27个循环)及电泳进样时间等。Promega公司的测试结果显示: 针对大部分的样本类型, 25个循环可得到良好的扩增效果。循环数应针对每个实验室的每个扩增样品类型进行优化。

1. 将MicroAmp®反应板置于热循环仪中。
2. 选择并运行推荐的循环程序。下面提供了使用GeneAmp® PCR System 9700热循环仪进行扩增的操作程序。
整个循环时间预计在1.5小时。

热循环程序¹

96°C for 1 minute, then:

94°C for 10 seconds

59°C for 1 minute

72°C for 30 seconds

for 25 cycles, then:

60°C for 20 minutes

4°C 保存

¹当使用GeneAmp® PCR system 9700热循环仪时, 程序必须在最大温度变化速率下运行(这需要一个银或金镀银的热模板)。热循环开始运行后可对温度变化速率进行设置。选择“Method”进入设置选项屏幕。选择“MAX mode”作为速率设置模式, 然后输入反应终体积。

3. 热循环程序结束后, 将扩增的产物保存在-20°C避光环境中。

注意: 将扩增样品长时间地保存在4°C或更高温度的环境中, 可能会使产物降解。

PCR优化

应根据初始预实验的结果对循环次数进行优化，从而确定收集方法、样本类型、以及仪器等各方面的灵敏性。

1. 选择几种本实验室经常用到的典型样品，按照常规的试验流程进行预处理。
2. 准备4个装有同样拭子提取样本的反应板。
3. 按照上面推荐的热循环程序进行扩增，但将每一个反应板设置不同的循环次数(24-27个循环)
4. 得到扩增数据之后，应用本实验室经过验证的提取及检测方案，确定每个样本类型的最优的循环次数。

5. 仪器设置及样品准备

5.A. 使用Applied Biosystems 3500或3500xL型遗传分析仪检测扩增片段。

用户准备的材料

- 95°C加热模块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰和冰水混合物
- 96孔板离心机
- 防回吸吸头
- 3500/3500xL毛细管矩阵, 36cm
- 96孔板固定器及底座装置(标准)(Applied Biosystems货号4410228)
- 用于3500或3500xL型遗传分析仪的POP-4™ Polymer
- 正极缓冲液槽
- 负极缓冲液槽
- 用于3500或3500xL型遗传分析仪的试剂袋
- MicroAmp®透光96孔板和隔片, 或者其他品牌的响应产品
- Hi-Di™甲酰胺(Applied Biosystems, 货号 4311320)
- PowerPlex 5C Matrix Standard (货号: DG4850)



甲酰胺的质量对实验很重要。甲酰胺应分装置于-20°C冻存，反复冻融或长时间的置于4°C保存会导致甲酰胺的降解。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时与DNA在发生竞争，这样会使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间不能增加信号强度。



甲酰胺为刺激性的致畸胎剂，应避免吸入以及直接接触皮肤。当操作此类试剂时，请仔细阅读警告标签，并请戴手套并佩戴防护眼镜。

样本准备

1. 按照以下组份混合内标(WEN ILS500)和Hi-Di™甲酰胺，制备上样缓冲液：
[(0.5μl WEN ILS500) × (电泳样本量)] + [(9.5μl Hi-Di™甲酰胺) × (电泳样本量)]

注意：可以通过增加或减少上样缓冲液中内标(WEN ILS500)的加入量，来调整内标峰值的高度。保持甲酰胺的量为9.5 μ l，根据内标的加入量来调整步骤3中混合缓冲液的加入量。

2. 漩涡振荡10~15s混匀。
3. 在每孔中加入10 μ l甲酰胺ILS混合缓冲液。
4. 加入1 μ l扩增产物(或1 μ l等位基因Ladder混合物)。用隔片将孔板覆盖。

注意：不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异，因此需要适当调节进样时间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在“数据收集”软件中，使用Library菜单中Instrument Protocol来调节进样时间和电泳电压。如果图谱的峰值仍高于预想值，为了得到更好的结果，可以在扩增反应时减少模板DNA的量，或减少循环数。如果减低了进样时间和电压，则需要相应降低橙色荧光的峰高阈值。

5. 必要时略微离心进样板，以消除气泡。
6. 将样本置于95 $^{\circ}$ C变性3分钟，立即放在冰上冷却3分钟，之后立即在遗传分析仪上电泳。

仪器准备

根据3500/3500xL型遗传分析仪的用户手册(*Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide*)，进行仪器保养维护、安装毛细管矩阵、更换缓冲液及胶，并进行空间定位。样品分析可参考3500/3500xL型遗传分析仪的用户手册。

1. 打开3500 Data Collection Software，仪表界面如图2所示。确保消耗品使用情况及仪器维护的状况均正常。

将炉温(Oven temperature)设置到60 $^{\circ}$ C，在首次进样30分钟前选择“Start Pre-Heat”进行预热。

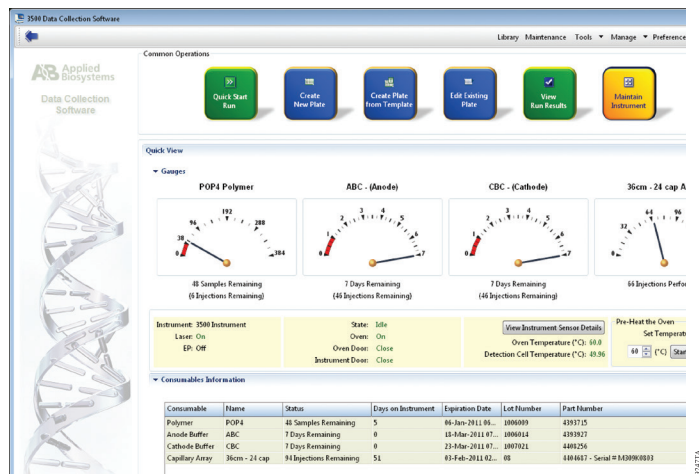


图2 3500仪表界面

2. 创建一个新的“Instrument Protocol”，在Library界面，选择“Instrument Protocol”，然后点击“Create”。或者选择先前设置过的“Instrument Protocol”。

图3显示了Promega公司在Applied Biosystems 3500/3500xL型遗传分析仪上对于Application Type、Dye set、Capillary length、Polymer、Run module以及相关的Protocol信息的默认设置。唯一需要更改的是将Dye Set改为相应的光谱设置。

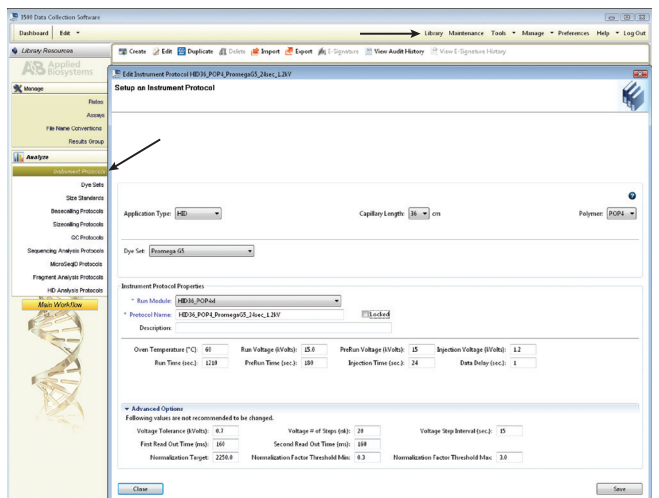


图3 创建新的“Instrument Protocol”的窗口

推荐的设置如下：

Application Type	HID
Capillary Length	36cm
Polymer	POP-4 TM
Dye Set	G5 (Promega G5 spectral)
Run Module	HID36_POP4(xl)
Injection Time ¹	24 seconds
Injection Voltage	1.2kV
Run Time	1,210–1,500 seconds

¹进样时间“Injection time”可根据峰高进行调整(2–24 seconds)。

创建“Instrument Protocol”时，须选用Promega的5色荧光进行光谱校正时所选用的“Dye Set”。我们建议电泳时间为1,210–1,500秒，选用仪器默认的进样参数。

❗ 进样时间和其它设置需要根据各实验室的具体情况进行优化。

在各自实验优化进样参数时，可根据不同的情况创建新的不同“Instrument

Protocol”。如果只用一个“Instrument Protocol”进行修改，可根据3500的手册进行条目编辑。

为该“Protocol”命名。

注意：如需作进一步的更改请参考3500/3500xL的用户手册。

3. 通过“Library”界面为“QC Protocol”创建一个新的“Size Standard”，选择“Size Standard”，然后点击“Create”。或者选择以前一个“Size Standard”进行修改。

为该“Size Standard”命名为“PPlex_ILS500”或者其它合适的名字。荧光颜色选择橙色。片段长度分别为60、65、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475和500bp。见图4。

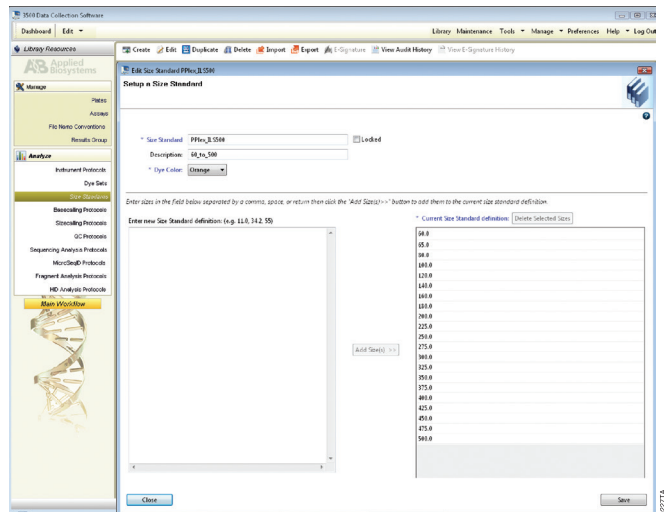


图4 创建“Size Standard”的窗口

4. 通过“Library”界面创建一个新的“QC protocol”。选择“QC Protocol”，然后点击“Create”。或者选择以前一个“QC protocol”进行修改。

为该“QC Protocol”命名，选择步骤3中所创建的“Size Standard”。“QC Protocol”的设置应根据Applied Biosystems 3500/3500xL型遗传分析仪上关于PowerPlex® 21系统的内部认证条件。各参数的设置见图5。

注意：WEN ILS500的峰值高度通常略低于其他颜色，因此橙色的峰高阈值需低于其他颜色。

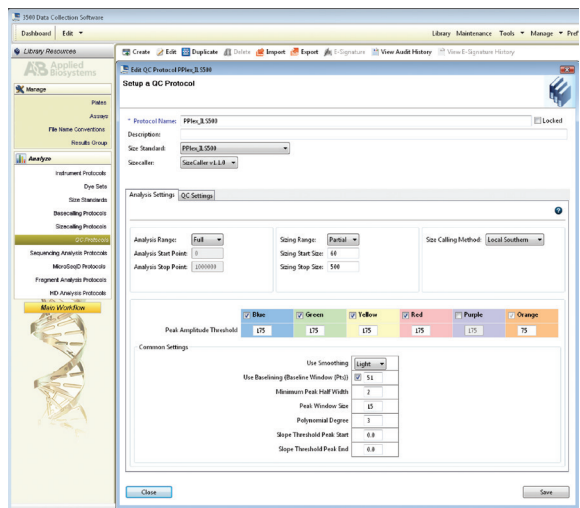


图5 创建“QC protocol”的窗口

5. 创建一个新的“Assay”，先点击“Library”，选择“Assay”，然后点击“Create”。或者选择以前一个“Assay”进行修改。

创建“Assay”的界面见图6，请选择步骤2创建的“Instrument Protocol”和步骤4创建的“QC Protocol”。并为该“Assay”命名。“Application Type”选择HID。电泳板中的每个命名的样品都需要选择相应的“Assay”。

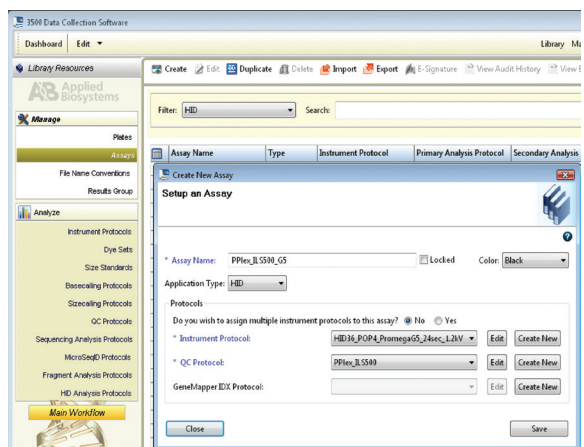


图6 创建“Assay”的窗口

6. 创建一个新的“File name Convention”（见图7），先点击“Library”，选择“File name Convention”，然后点击“Create”。或者选择以前一个“File name Convention”进行修改。

根据实验室的实际情况选择文件命名的属性，为该“File name Convention”命名后保存。

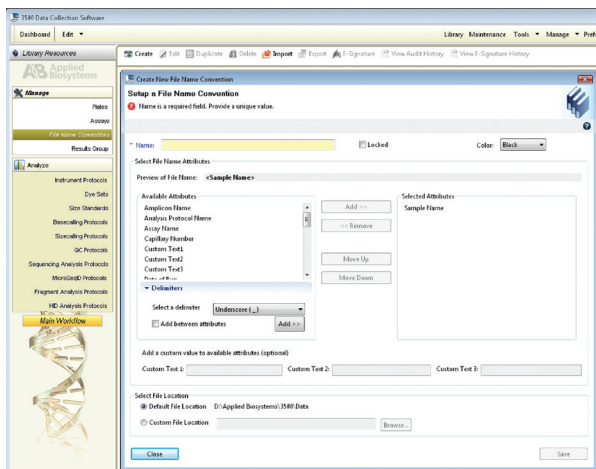


图7 创建“File name Convention”的窗口

7. 创建一个新的“Results Group” (见图8), 先点击“Library”, 选择“Results Group”, 然后点击“Create”。或者选择以前一个“Results Group”进行修改。

根据实验室的实际情况选择结果保存的属性，为该“Results Group”命名后保存。

8. 创建一个新的进样板“Plate”, 先点击“Library”, 从“Manage menu”中选择“Plate”, 然后点击“Create”。

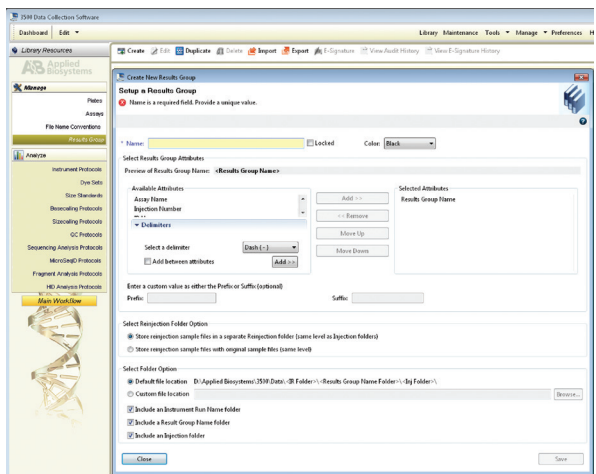


图8 创建“Results Group”的窗口

9. 为新的进样板命名。板的属性从下拉菜单选择“HID”（见图9）。

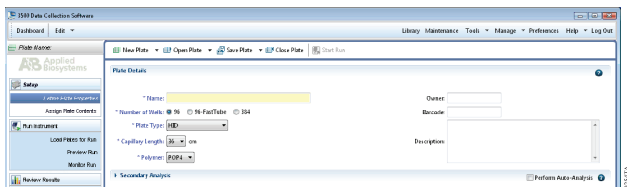


图9 定义进样板的属性

10. 选择“Assign Plate Contents”（见图10）。

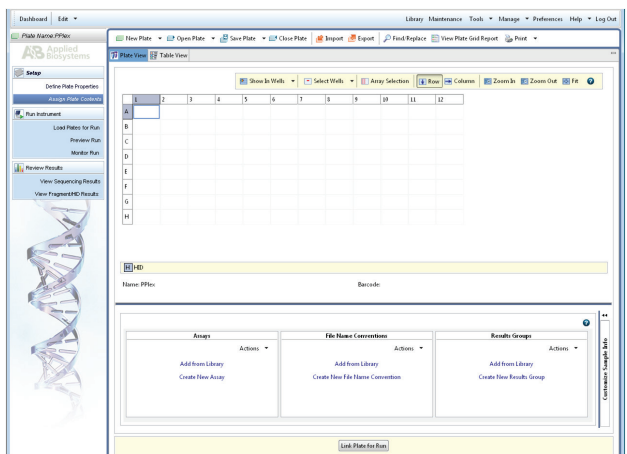


图10 进样板属性的命名

11. 在每个相应的孔中输入相应的样品信息。
12. 在左下角处，在“Assay”目录下，点击“Add from Library”按钮，选择步骤5中或先前创建的“Assay”。点击“Add to Plate”按钮，然后关闭窗口。
13. 在“File Name Convention”的方框中，点击“Add from Library”按钮，选择步骤6中或先前创建的“File Name Convention”。点击“Add to Plate”按钮，然后关闭窗口。
14. 在“Results Group”的方框中，点击“Add from Library”按钮，选择步骤7中或先前创建的“Results Group”。点击“Add to Plate”按钮，然后关闭窗口。
15. 选中含有样品的孔，然后在刚设置好的“Assay”、“File Name Convention”和“Results Group”的小方框中打钩。
16. 点击“Link Plate for Run”。
17. Load Plate窗口出现后，选择“Yes”。
18. 在“Run information”的窗口中(见图11)，为该进样板命名，然后点击“Start Run”。

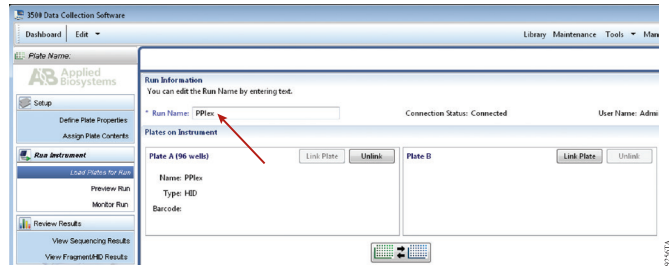


图11 为进样板命名

5.B 使用ABI PRISM® 3100或3100-Avant 型遗传分析仪，Version 2.0 版本数据收集软件，或使用Applied Biosystems 3130 或3130xl 型遗传分析仪，Version 3.0 版本数据收集软件，检测扩增片段。

用户准备的材料

- 95°C加热模块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰和冰水混合物
- 96孔板离心机
- 防回吸吸头
- 3100或3130毛细管矩阵，36cm
- 用于3100或3130的Performance Optimized Polymer 4(POP-4™)
- 含EDTA的10×遗传分析仪缓冲液
- MicroAmp®透光96孔板和隔片，或其他品牌的相应产品
- Hi-Di™甲酰胺(Applied Biosystems, 货号 4311320)
- PowerPlex 5C Matrix Standard (货号DG4850)



甲酰胺的质量对试验很重要。请使用Hi-Di™甲酰胺。甲酰胺应分装置于-20°C冻存，反复冻融或长时间的置于4°C保存会导致甲酰胺的降解。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时与DNA在发生竞争，这样会使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间不能增加信号强度。



甲酰胺为刺激性的致畸胎剂，应避免吸入以及直接接触皮肤。当操作此类试剂时，请仔细阅读警告标签，并请戴手套并佩戴防护眼镜。

样本准备

1. 按照以下组份混合内标(WEN ILS500)和Hi-Di™甲酰胺，制备上样缓冲液：

$[(0.5\mu\text{l WEN ILS500}) \times (\text{电泳样本量})] + [(9.5\mu\text{l Hi-Di}^{\text{TM}}\text{甲酰胺}) \times (\text{电泳样本量})]$

注意：在试验操作中，可以通过增加或减少上样缓冲液中内标(WEN ILS500)的加

入量，来调整标准峰值的高度。保持甲酰胺的量为9.5 μ l，根据内标的加入量来相应调整步骤3中上样缓冲液的加入量。

2. 漩涡振荡10 ~ 15s混匀。
3. 在每孔中加入10 μ l甲酰胺/ILS混合缓冲液。
4. 加入1 μ l扩增产物(或1 μ l PowerPlex[®] 21等位基因Ladder混合物)。用隔片将孔板覆盖。

注意：不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异，因此需要适当调节进样时间、进样电压或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在“数据收集”软件中，可修改Module Manager中的电泳程序，来调节进样时间和电泳电压(参见下面的“仪器准备”章节)。如果降低了进样时间和电压，也要相应降低橙色荧光检测峰高的阈值。

5. 低速离心进样板，以消除气泡。
6. 将样本置于95 $^{\circ}$ C变性3分钟，立即放在冰上冷却3分钟，之后立即放入遗传分析仪上电泳。

仪器准备

参照仪器的“用户操作说明”进行毛细管矩阵的清洗和安装，并进行空间校正及灌胶。

使用2.0版本(version 2.0)数据收集软件进行样品分析时，请参照ABI PRISM[®] 3100或3100-Avant遗传分析仪使用手册；使用3.0版本(version 2.0)数据收集软件进行样品分析时，请参照Applied Biosystems 3130或3130xl型遗传分析仪的用户操作手册，并进行如下改动：

1. 在“Module Manager”中点击“New”。在“Type”下拉菜单中选择“Regular”，然后“Template”下拉菜单中选择“HIDFragmentAnalysis36_POP4”。确认进样时间为5s、进样电压为3kV、电泳时间为1500s。为您这套新的运行模式命名，然后点击“OK”。

注意：由于仪器灵敏度的差异，Module Manager中的进样时间和进样电压应做适当调节。我们推荐的进样时间范围为3 ~ 22seconds，进样电压为1 ~ 3kV。

2. 在“Protocol Manager”中点击“New”，并为新程序命名。在“Type”下拉菜单中选择“Regular”，然后在“Run Module”下拉菜单中选择在上一步骤中创建的运行模式。最后，在“Dye-Set”中选择“G5”，点击OK。
3. 进入Plate Manager，参照仪器的用户使用说明书创建一个新的平板记录。在随后出现的对话框中的Application下拉菜单中选择GeneMapper-Generic，并且选择所用的平板类型(96-well)，输入备注信息，点击OK。

注意：如果希望对样本数据进行自动分析，请参照仪器的用户使用说明书。

4. 在GeneMapper平板记录中输入相应的样本信息，向右拉动滚动条，在Results Group 1栏目中选择保存结果的组，在Instrument Protocol 1栏目中选择在步骤2中创建的新程序。确认所有样本的栏目中都包含了这些信息，点击OK。

注意：在Results Group栏目的下拉菜单中点击New，可以创建一个新的结果组，选

择General标签, 输入组名, 选择Analysis标签, 然后在Analysis type下拉菜单中选择GeneMapper-Generic。

5. 将样品板放在仪器上, 关上仪器门。
6. 在spectral viewer界面中, dye set选择使用PowerPlex 5C进行校正的G5, 并确认处于激活状态。



正确选择用PowerPlex[®] 5-Dye进行光谱校正的G5是非常重要的。

如果被激活的Dye set不是PowerPlex[®] 5-Dye, 请在Calibration下拉菜单中选择使用PowerPlex[®] 5-Dye进行光谱校正的Dye-Set G5, 然后点击“Set”。

7. 在运行程序列表中, 选中在步骤3、4中创建的样品板记录, 并且单击使其变亮。
8. 选中样品板记录后, 点击与自动进样器上放置的待检测的样品板相对应的位置的样品板图标。
9. 当样品板记录与样品板连接后, 样品板图标将从黄色变成绿色, 并且绿色的Run Instrument的箭头按钮被激活。
10. 点击工具栏中绿色的Run Instrument的箭头按钮, 样品开始电泳。
11. 通过观察收集软件中的运行状态、毛细管阵列以及毛细管视窗来监测电泳。每组进样用时约40分钟。

6. 数据分析

6.A GeneMapper[®] ID-X软件(1.2版本)中PowerPlex[®] 21系统 Panels, Bins 和 Stutter的设置

为了便于分析PowerPlex[®] 21系统生成的数据, 我们创建了可以使用GeneMapper[®] ID-X软件进行自动基因分型的Panels和Bins文件。我们建议用户从Applied Biosystems获得有关GeneMapper[®] ID-X软件的应用培训, 以便熟悉软件, 并能够正确操作该软件。

注意: 此处提到的Panels和Bins文件与之前的GeneMapper[®] ID-X软件版本是相匹配的。

预先准备

1. 登录网站: www.promega.com/resources/tools/genemapper-idsoftware-panels-and-bin-sets/ 获得适用于PowerPlex[®] 21系统的Panels, Bins和Stutter文件。
2. 输入您的联系信息, 选择“GeneMapperID-X”, 点击“Submit”。
3. 将PowerPlex_21_Panels_IDX_vX.x.txt, PowerPlex_21_Bins_IDX_vX.x.txt 和 PowerPlex_21_Stutter_IDX_vX.x.txt 文件保存到电脑的已知位置上, 这里的“X.x”指的是最新版本的Panels和Bins文件。

导入Panels, Bins和Stutter文件

1. 打开GeneMapper[®] ID-X软件。

2. 选择“Tools”，然后再选择“Panel Manager”。
3. 点亮左侧板块上方(导向窗格)的Panel Manager图标。
4. 在File下拉菜单中点击“Import Panels”。
5. 找到之前已经下载好的Panels文件，然后点击“Import”。
6. 在导向窗格中，点亮在第5步中刚导入的PowerPlex21Panels文件夹。
7. 在File下拉菜单中点击“Import Bin Set”。
8. 找到之前已经下载好的Bins文件，然后点击“Import”。
9. 在导向窗格中，点亮在第5步中刚导入的PowerPlex21Panels文件夹。
10. 在“File”中选择“Import Marker Stutter”，跳出的对话框中提示是否覆盖当前值。选择“Yes”。
11. 找到之前已经下载好的stutter文件，选择File,然后点击“Import”。
12. 在Panel Manager视窗的底部，点击“Apply”，然后点击OK。这样就保存了Panels、Bins和Stutter文件，然后关闭窗口。

6.B 用GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)创建标准片段

创建标准片段有两种选择，一种是当前的流程，另一种是按章节6.C的流程。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper® ID-X Manager”。
2. 点击“Size Standard”选项。
3. 点击“New”。
4. 在Size Standard编辑窗口中(图12)，选择“GeneMapper® ID-X Security Group”作为安全小组。这样可允许使用该软件的所有用户进入。也可使用其他的安全小组。

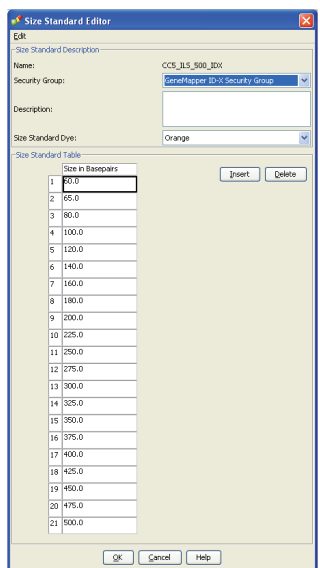


图 12. The GeneMapper® ID-X标准片段编辑

5. 输入一个名称，例如“WEN_ILS_500_IDX”
6. 选择橙色(orange)作为标准片段颜色。
7. 输入标准片段的标准值(60, 65, 80, 100, 120,140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 和500)。请参考章节9.C, 图 24。
8. 点击“OK”。

6.C 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中导入WEN ILS500 IDX标准片段

WEN_ILS_500_IDX.xml 文件可从

www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-binsets/下载获得。

将WEN_ILS_500_IDX.xml 文件保存到电脑的已知位置。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper® ID-X Manager”。
2. 点击Size Standard 选项。
3. 点击“Import”。
4. 找到之前在电脑中已经存好的WEN_ILS_500_IDX.xml文件。
5. 点亮该文件，然后选择“Import”。
6. 选择“Done”以保存变化设置，然后关闭GeneMapper® ID-X Manager。

6.D. 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中创建案件样本的分析方法

这些说明只是教您如何用GeneMapper® ID-X软件对数据进行分析，没有详细介绍如何使用该软件。我们建议用户联系Applied Biosystems进行该软件的培训。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper® ID-X Manager”。
2. 点击Analysis Methods选项。
3. 点击“New”，将会弹出一个新的分析方法对话框。
4. 在Analysis Method编辑窗口下，点击“GeneMapper® ID-X Security Group”作为安全小组，这可以允许所有用户都可以访问该软件，也可以应用其它的安全小组。
5. 为分析方法命名，例如“PowerPlex 21”。
6. 点击“Allele”选项。(图13)
7. 选择在章节6.A.中导入的bins文件。
8. 确保选择了“Use marker-specific stutter ratio if available”。
9. 我们建议在使用PowerPlex® 21 System时，参照图13输入相应的数值，以适当的滤过Stutter杂峰。您可能需要优化设置。请进行实验室内部认证。

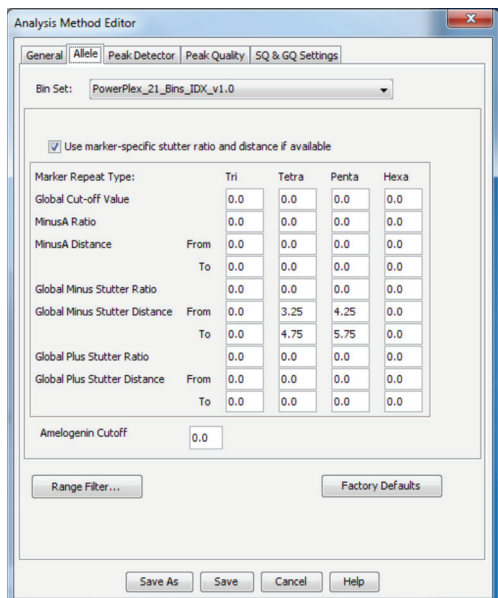


图13. GeneMapper® ID-X Allele选项，选择在章节6.A中导入的bins文件

10. 点击“Peak Detector”选项，图 14为Promega公司的设置参照图。您可能需要优化设置。请进行实验室内部认证。

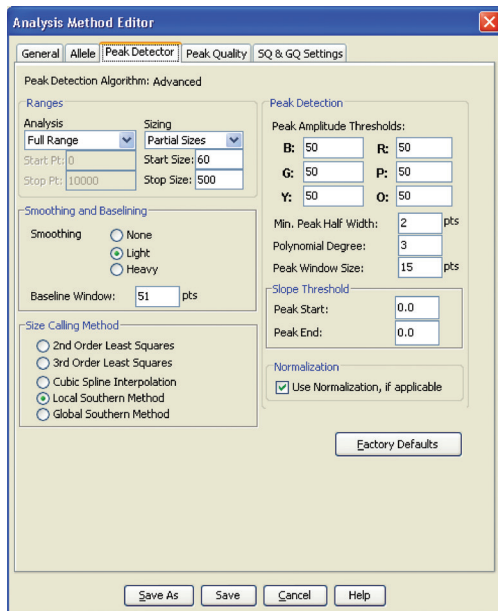


图14. GeneMapper® ID-X “Peak Detector” 选项

注意:

1. 分析片段可以选择“全片段分析(full range)”或“部分片段分析(partial range)”。当使用部分片段分析功能, 根据电泳数据选择适当的分析片段; 起始点位于将引物峰后、第一个定义的内标峰前, 并可借此确定正确的内标片段值。
2. 峰阈值(peak amplitude thresholds)是指软件可识别的最小峰高值。对于ABI PRISM[®] 3100和3100-Avant遗传分析仪及Applied Biosystems3130和3130xl遗传分析仪, 峰阈值通常在50-150RFU。对于Applied Biosystems3500和3500xL遗传分析仪, Life Technologies建议在其默认的电泳条件下, 阈值通常为175RFU。但是, 各自实验室应根据自己认证的情况来确定峰阈值。WEN ILS的峰高通常比其它颜色的峰高要低。因此, 橙色的阈值通常要比其它颜色的阈值要低。
3. 进行数据收集时, 不管是否应用normalization, normalization窗口都会被检验。

11. 点击选择Peak Quality界面。您可以改变Peak Quality的设置以调节峰值质量。

注意: 对于步骤11、12的设置, 请参阅GeneMapper[®] ID用户使用手册获得更多信息。

12. 点击选择SQ & GQ 设置选项。您可以改变设置。
13. 点击“Save”保存新的分析方法。
14. 点击“Done”退出GeneMapper[®] ID-X Manager。

案件样本数据处理

1. 点击“File”中的“New Project”。
2. 选择“Edit”, 之后再选择“Add Samples to Project”。
3. 浏览运行文件, 点亮要分析的文件, 点击“Add to list”, 之后点击“Add”。
4. 在Sample Type栏目中, 使用下拉菜单标明样本类型(Allelic Ladder、Sample、Positive Control或Negative Control)。Project中的每组文件必须电泳一个Ladder, 并在Sample Type栏目中标记为“Allelic Ladder”, 以进行正确的分型分析。
5. 在Analysis Method栏目中, 选择上面已经创建好的Analysis Method。
6. 在Panel栏目中选择在章节6.A中导入的Panels文件。
7. 在Size Standard栏目中, 选择先前在章节6.B创建或6.C中导入中创建的片段标准“Size Standard”。
8. 点击Analyze(绿色箭头键), 开始数据分析。

注意: 在默认情况下, 软件在对质量审查完之后, 软件会给出“Analysis Requirement Summary”、“Allelic Ladder Analysis Summary”和“Analysis Summary”窗口。确保所有的要求与窗口显示出来的一致。如果你没能将“Analysis Requirement Summary”窗口激活, 你可能需要进行手动排除故障。

9. 如果所有的分析要求相匹配, 将会弹出“Save Project”窗口(图15)。

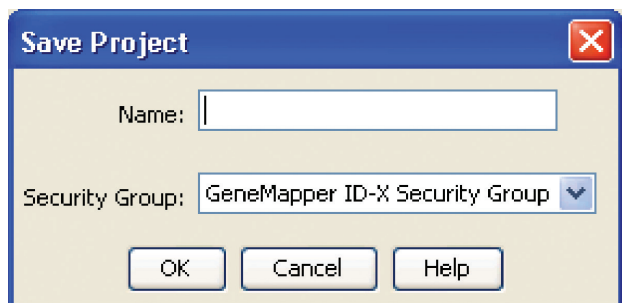


图15. 保存项目窗口

10. 为Project命名。
11. 在下拉菜单中选择“applicable security group”，再点击“OK”。

注意：如果等位基因 ≥ 475 bp，将无法使用Local Southern Method。对于Penta E位点，如果等位基因 > 24 ，将会被标记为“OL”。

分析结束后，会弹出“Analysis Summary”窗口。我们建议您在“plot view”中查看所有标注为黄色或红色头标的位点，并且根据实验室标准操作流程来处理。在“Genotype”选项或“Samples”选项中，使用默认的“Data Interpretation plot settings”和“Quality Value Details”中的内容来协助检查低质量样品。

在“Analysis Method Peak Quality”和“SQ & GQ”设置选项中的数值是默认的，这些数值会影响在画面设置中的质量值。我们建议您可根据本实验室数据的具体情况来修改这些数值。

6.E. 在GeneMapper® ID-X软件(1.2版本)中创建数据库或亲子鉴定的分析方法

这些说明只是引导您如何用GeneMapper® ID-X软件分析数据，没有详细介绍如何使用该软件。我们建议用户联系Applied Biosystems进行该软件的培训。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper ID-X Manager”。
2. 点击Analysis Methods选项。
3. 点击“New”，将会弹出一个新的分析方法对话框。
4. 在Analysis Method编辑窗口下，点击“GeneMapper® ID-X Security Group”作为安全小组，这可以允许所有用户都可以访问该软件，也可以应用其它的安全小组。
5. 为分析方法命名，例如“PowerPlex21 20% Filter”。
6. 点击“Allele”选项(图 16)。

7. 选择在章节6.A.中导入的bins文件。
8. 在使用PowerPlex® 21 System时，我们建议参照图16输入相应的数值，以适当的滤过Stutter杂峰。您可能需要优化设置，须进行实验室内部认证。

注意：在将Tetra和Penta重复基因座的Global Cut-off值设置为0.20，以确保分析方法中影子带的过滤值为20%。

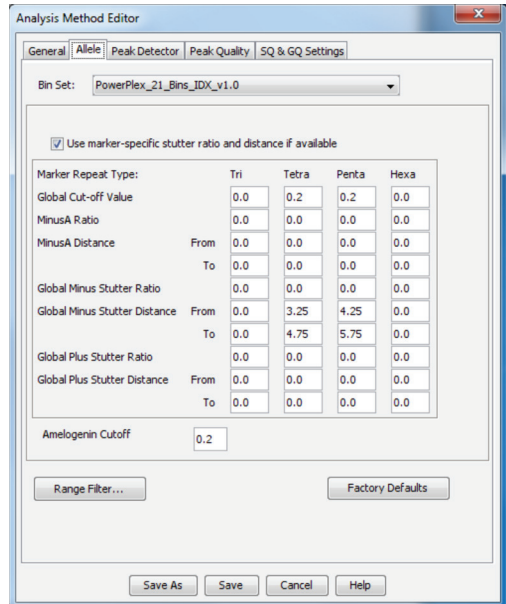


图 16. GeneMapper® ID-X Allele界面。选择在章节6.A.中导入的bins文件

9. 点击“Peak Detector”选项，图14为Promegag公司的设置参照图。您可能需要优化这些设置，并进行实验室内部认证。

注意：

1. 分析片段可以选择“全片段分析(full range)”或“部分片段分析(partial range)”。当使用部分片段分析功能，根据电泳数据选择适当的分析片段：起始点位于将引物峰后、第一个定义的内标峰前，并可借此确定正确的内标片段值。
 2. 峰阈值(peak amplitude thresholds)是指软件可识别的最小峰高值。对于ABI PRISM® 3100及3100-Avant遗传分析仪器和Applied Biosystems 3130和3130xl遗传分析仪器，峰阈值通常在50-150RFU。对于3500和3500xL遗传分析仪器，Life Technologies建议在其默认的电泳条件下，阈值通常为175RFU。各自实验室应根据自己认证的情况来确定峰阈值。WEN ILS500的峰高通常比其它颜色的峰高要低。因此，橙色的阈值通常要比其它颜色的阈值要低。
 3. 进行数据收集时，不管是否在应用normalization，normalization窗口都会被检验。
10. 点击选择Peak Quality界面。您可以改变Peak Quality的设置。

注意: 对于步骤10、11的设置, 请参阅GeneMapper® ID-X用户使用手册获得更多的帮助信息。

11. 选择“SQ & GQ”选项, 您可以更改这些设置。
12. 点击“save”保存新建的分析方法。
13. 点击“Done”退出“GeneMapper ID-X Manager”。

数据库或亲子鉴定样本数据处理

1. 点击“File”中的“New Project”。
2. 选择“Edit”, 然后选择“Add Samples to Project”。
3. 浏览运行文件, 点亮要分析的文件, 点击“Add”, 之后选择“Add to list”。
4. 在Sample Type栏目中, 使用下拉菜单选择Allelic Ladder、Sample、Positive Control或Negative Control标明样本类型。Project中的每组文件必须电泳一个Ladder, 并在Sample Type栏目中标记为“Allelic Ladder”, 以进行正确的分型分析。

在Analysis Method栏目中, 选择前面已经创建好的Analysis Method。

5. 在Panel栏目中选择在章节6.A中导入的Panels文件。
6. 在Size Standard栏目中, 选择章节 6.B创建或章节6.C中创建的片段标准“Size Standard”。
7. 点击Analyze(绿色箭头键), 开始数据分析。

注意: 在默认情况下, 软件在质量审查完之后, 软件会给出“Analysis Requirement Summary”、“Allelic Ladder Analysis Summary”和“Analysis Summary”窗口。确保所有的要求与窗口显示出来的一致。如果你没能将“Analysis Requirement Summary”窗口激活, 你可能需要进行手动排除故障。

8. 如果满足所有的分析要求, 将会弹出“Save Project窗口”(图15)。
9. 为Project命名。
10. 在下拉菜单中选择合适的安全小组,再点击“OK”。

注意: 如果等位基因 $\geq 475\text{bp}$ 将无法使用Local Southern Method。对于Penta E, 如果等位基因 > 24 , 将会被标记为“OL”。

分析结束后, 会弹出“Analysis Summary”窗口。我们建议您在“plot view”中查看所有标注为黄色或红色头标的位点, 并且根据实验室标准操作流程来处理。在“Genotype”选项或“Samples”选项中, 使用默认的“Data Interpretation plot settings”和“Quality Value Details”中的内容来协助检查低质量样品。

在“Analysis Method Peak Quality”和“SQ & GQ”设置选项中的数值是默认的, 这些数值会影响在画面设置中的质量值。我们建议您可根据本实验室数据的具体情况来修改这些数值。

6.F. GeneMapper® ID (3.2版本)PowerPlex® 21 Panels和Bins的设置

为了便于分析使用PowerPlex® 21系统得到的数据，我们创建了可以使用GeneMapper® ID软件(3.2版本)进行自动基因分型的Panels 和Bins文件。对于使用GeneMapper® ID软件(3.2版本)的用户，我们建议浏览*Applied Biosystems GeneMapper® ID Software Human Identification Analysis Tutorial*，以熟悉软件的正规操作。对于使用GeneMapper® ID软件(3.1版本)的用户，我们建议将软件升级至3.2版本。

应用GeneMapper® ID软件(3.2版本)进行分析时，需要合适的Panels和 Bins文件：PowerPlex_21_Panels_vX.x.txt 和PowerPlex_21_Bins_vX.x.txt 文件，此处提到的“X.x”是指最新版本的Panels和Bins文件。

预先准备

1. 请登陆www.promega.com/resources/tools/genemapper-id- software- panelsand-bins/ 下载适于PowerPlex®21系统的panels和bins文件。
2. 输入您的联系信息，点击“GeneMapperID version3.2”，然后点击“Submit”。
3. 将PowerPlex_21_Panels_X.x.txt 和PowerPlex_21_Bins_X.x.txt文件保存到电脑的已知位置。这里的“X.x”是指Panels和bins文件的最新版本。

导入Panels和Bins文件

这些说明应参照Applied Biosystem GeneMapper® ID软件使用指南，第1~4页，配合使用。

1. 打开GeneMapper® ID软件(3.2版本)。
2. 打开Tools中的“Panel Manager”。
3. 点亮左侧板块上方(导向窗格)的Panel Manager图标。
4. 打开File中的“Import Panels”。
5. 找到在开始时已下载好的Panels文件，点击“Import”。
6. 在导向窗格中，点亮在步骤5中刚导入的PowerPlex 21 panels文件夹。
7. 点击File中的“Import Bin Set”。
8. 找到之前已经下载好的bins文件，然后点击“Import”。
9. 在Panel Manager视窗的底部，点击“Apply”，然后点击“OK”。Panel Manager视窗会自动关闭。

6.G GeneMapper® ID (3.2) 创建标准片段

创建标准片段有两种选择，一种是当前的流程，另一种是按章节6.H的流程

1. 打开“Tools”中的“GeneMapper Manager”。

2. 点击选择Size Standard界面。
3. 点击“New”。
4. 选择“Basic or Advanced”(图17)。选择分析方法的模式必须与先前创建的分析方法模式相匹配。点击OK。

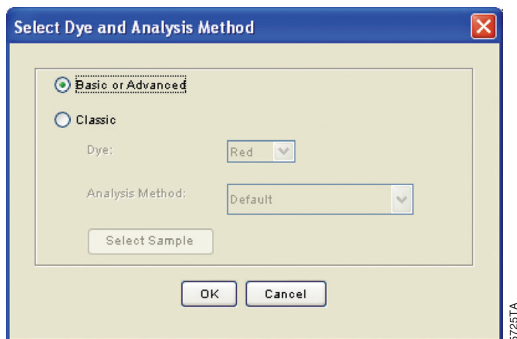


图17.荧光选择和分析方法窗口

5. 在Size Standard编辑窗口中输入一个命名，例如“WEN ILS60 to 500”(图18)。
6. 选择橙色作为标准片段颜色。
7. 输入标准片段的标准值(60、65、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475和500)。参考章节9.C,图24。
8. 点击“OK”。

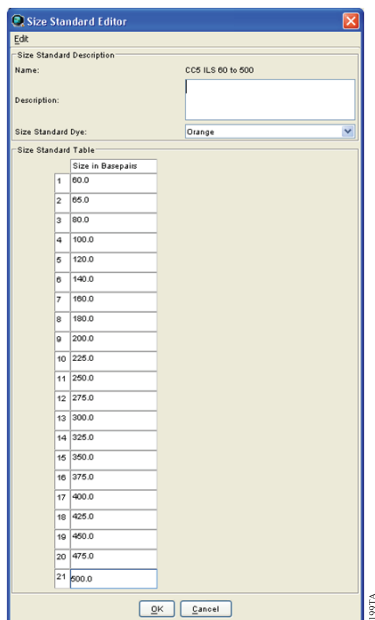


图18.标准片段编辑界面

6.H. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中导入WEN ILS500标准片段

WEN_ILS_500_IDX.xml 文件的下载地址:

www.promega.com/resources/tools/genemapper-id-software-panels-and-bin-sets/。将 WEN_ILS_500.xml 文件保存到电脑的已知位置。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper Manager”。
2. 点击Size Standard 选项。
3. 点击“Import”。
4. 在电脑中找到之前已经存好的WEN_ILS_500.xml文件。
5. 点亮该文件, 然后选择“Import”。
6. 选择“Done”保存修改的设置, 并且关闭GeneMapper® ID Manager。

6.I. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中创建案件样本的分析方法

以下的操作说明是参照GeneMapper® ID软件用户指南的5-11页。

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper Manager”。
2. 点击Analysis Methods选项。
3. 点击“New”, 将会弹出一个新的分析方法对话框。
4. 选择“HID”, 点击OK。

注意: 如果您没有看到HID选项, 表明您没有安装GeneMapper® ID软件。请联系 Applied Biosystems。

5. 为分析方法命名, 例如“PowerPlex 21”。
6. 点击“Allele”选项(图19)。
7. 选择在章节6.F.中导入的bins文件。
8. 确保勾选了“Use marker-specific stutter ratio if available”。
9. 在使用PowerPlex® 21系统时, 我们建议参照图19输入相应的数值, 以适当的滤过Stutter杂峰。如果需要获得此项设置的用途及产生的影响, 请参阅 Applied Biosystems用户手册中的“*Installation Procedures and New Features for GeneMapper® ID Software 3.2*”。

注意: 有些设置是经优化了的, 所以会与用户指南推荐的设置有所不同。

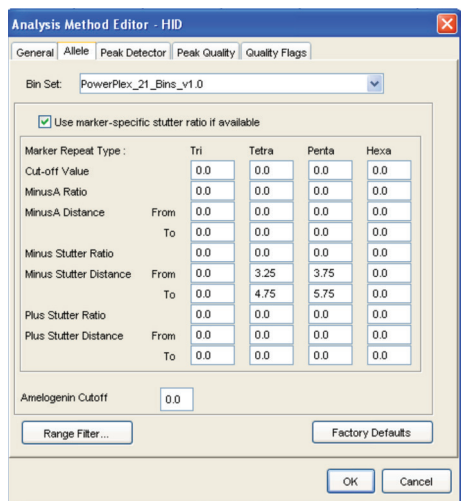


图 19. GeneMapper® ID的Allele界面。选择在章节6.F.中导入的bins文件

10. 点击“Peak Detector”选项，图20为设置参照图。

注意:

1. 分析片段可以选择“全片段分析(full range)”或“部分片段分析(partial range)”。当使用部分片段分析功能，根据电泳数据选择适当的分析片段：起始点位于将引物峰后、第一个定义的内标峰前，并可借此确定正确的内标片段值。
2. 峰阈值(peak amplitude thresholds)是指软件可识别的最小峰高值。仪器峰阈值通常在50-150RFU，并且个别实验室应根据自己认证的情况来确定峰阈值。WEN ILS500的峰高通常比其它颜色的峰高要低。因此，橙色的阈值通常比其它颜色低。

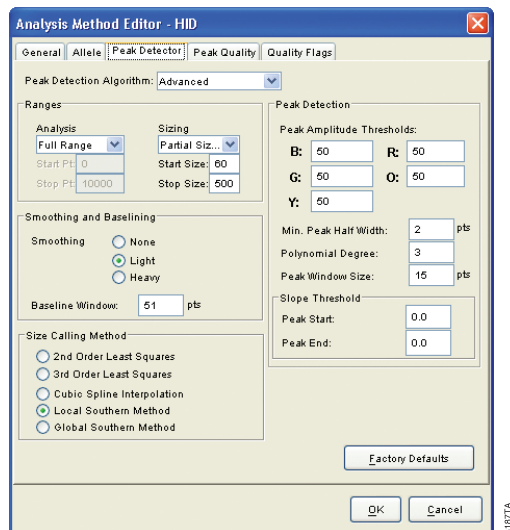


图20. The GeneMapper® ID “Peak Detector”选项

11. 点击选择Peak Quality界面。您可以改变Peak Quality的设置。

注意：对于步骤11、12的设置，请参阅GeneMapper® ID用户使用手册获得更多的帮助信息。

12. 点击选择Quality Flags选项。您可以改变这些设置。

13. 点击“OK”保存设置。

案件样本数据处理

1. 点击“File”中的“New Project”。
2. 选择“Edit”，之后再选择“Add Samples to Project”。
3. 浏览运行文件，点亮要分析的文件点击“Add”，然后选择“Add to list”。
4. 在Sample Type栏目中，使用下拉菜单标明样本类型(Ladder、Sample、Positive Control或Negative Control)。Project中的每组文件必须电泳一个Ladder，并在Sample Type栏目中标记为“Allelic Ladder”，以进行正确的分型分析。
5. 在Analysis Method栏目中，选择前面已经创建好的Analysis Method。
6. 在Panel栏目中选择在章节6.F中导入的Panels文件。
7. 在Size Standard栏目中，选择先前在章节6.G创建或6.H导入的片段标准。
8. 点击Analyze(绿色箭头键)，开始数据分析。

注意：如果等位基因 ≥ 475 bp，将无法使用Local Southern Method。对于Penta E，如果等位基因 > 24 ，将会被标记为“OL”。

6.J. 在GeneMapper® ID软件(3.2版本)中创建数据库或亲子鉴定的分析方法

1. 在“Tools”中选择“GeneMapper Manager”。
2. 点击Analysis Methods选项。
3. 点击“New”，将会弹出一个新的分析方法对话框。
4. 选择“HID”，点击“OK”。

注意：如果您没有看到HID选项，表明您没有安装GeneMapper® ID软件。请联系Applied Biosystems。

5. 为分析方法命名，例如“PowerPlex21_20% Filter”。
6. 点击“Allele”选项(图21)。
7. 选择在章节6.F中导入的bins文件。
8. 确保勾选“Use marker-specific stutter ratio if available”。
9. 在使用PowerPlex® 21系统时，我们建议参照图 21输入相应的数值，以适当的滤过Stutter杂峰。如果需要获得此项设置的用途及产生的影响，请参阅Applied Biosystems用户手册中的“*Installation Procedures and New Features for GeneMapper® ID Software 3.2*”。

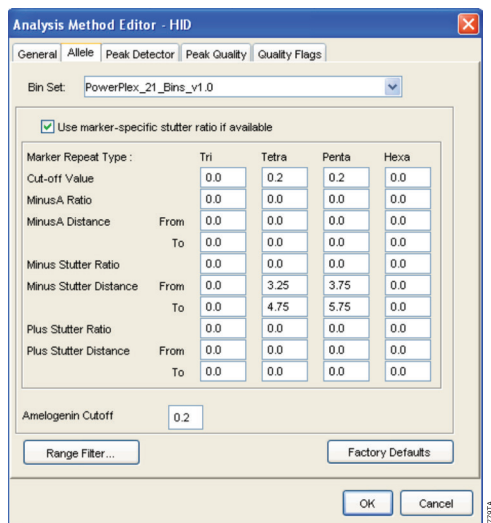


图 21. 使用20%杂峰过滤设置的Allele界面。选择在章节6.F中导入的bins文件

10. 点击“Peak Detector”选项，我们推荐按照图20进行设置。

注意:

1. 分析片段可以选择“全片段分析(full range)”或“部分片段分析(partial range)”。当使用部分片段分析功能，根据电泳数据选择适当的分析片段；起始点位于引物峰后、第一个定义的内标峰前，并可借此确定正确的内标片段值。
2. 峰阈值(peak amplitude thresholds)是指软件可识别的最小峰高值。峰阈值通常在50-150RFU。各自实验室应根据自己认证的情况来确定峰阈值。WEN ILS500的峰高通常比其它颜色的峰高要低。因此，橙色的阈值通常比其它颜色低

11. 点击选择Peak Quality界面。您可以改变Peak Quality的设置。

注意: 对于步骤11、12的设置，请参阅GeneMapper® ID用户使用手册获得更多的帮助信息。

12. 点击选择Quality Flags选项。您可以改变这些设置。

13. 点击“OK”保存设置。

数据库或亲子鉴定样本数据处理

1. 点击“File”中的“New Project”。
2. 选择“Edit”，之后再选择“Add Samples to Project”。
3. 浏览运行文件，点亮要分析的文件，点击“Add”，之后选择“Add to list”。
4. 在Sample Type栏目中，使用下拉菜单标明样本类型(Ladder、Sample、Positive Control或Negative Control)。Project中的每组文件必须电泳一个Ladder，并在

Sample Type栏目中标记为“Allelic Ladder”，以进行正确的分型分析。

5. 在Analysis Method栏目中，选择前面已经创建好的Analysis Method。
6. 在Panel栏目中选择在章节6.F中导入此Panels文件。
7. 在Size Standard栏目中，选择先前在章节6.G创建或6.H导入的片段标准。
8. 点击Analyze(绿色箭头键)，开始数据分析。

注意：如果等位基因 ≥ 475 bp将无法使用Local Southern Method。对于Penta E, 如果等位基因 > 24 ，将会被标记为“OL”。

6.K. 对照

1. 观察阴性对照结果。参照本手册的程序，阴性对照结果中不应有扩增产物。
2. 观察2800M Control DNA阳性对照结果。将对照DNA等位基因重复片段与特定位点的等位基因Ladder对比。2800M control DNA等位基因全部位点分型参见表6(章节9.A)。

6.L. 结果

PowerPlex[®] 21系统典型的结果图谱参见图 22。PowerPlex[®] 21 Allelic Ladder Mix 结果参见图 23。

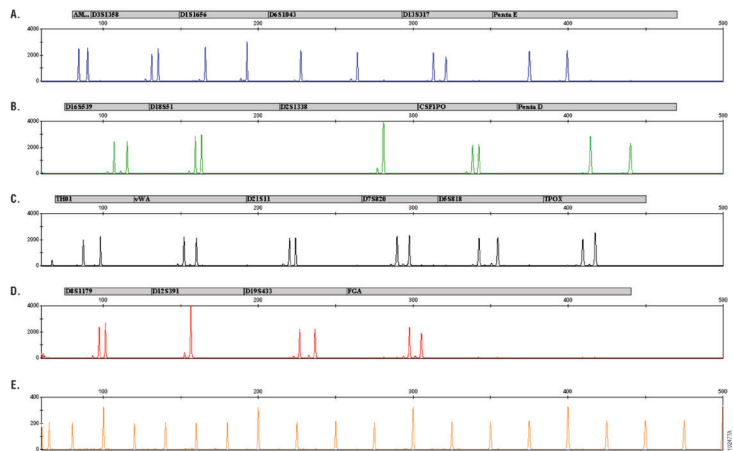


图22. PowerPlex[®] 21系统。用PowerPlex[®] 21 5X Primer Pair Mix扩增单一来源的DNA模板(0.5ng)。将扩增产物与内标WEN混合，在Applied Biosystems3130型遗传分析仪上，使用3kV电压、5秒进样模式进行电泳检测。电泳结果使用GeneMapper[®] ID软件(3.2版本)进行分析。**Panel A.** 使用荧光素(FL)标记位点的电泳峰图：Amelogenin, D3S1358, D1S1656, D6S1043, D13S317和Penta E。**Panel B.** 使用JOE-标记位点的电泳峰图：D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO和Penta D。**Panel C.** 使用TMR-标记位点的电泳峰图：TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818和TPOX。**Panel D.** 使用CXR-标记位点的电泳峰图：D8S1179, D12S391, D19S433和FGA。图 E. 内标(WEN)60bp至500bp片段的电泳峰图。

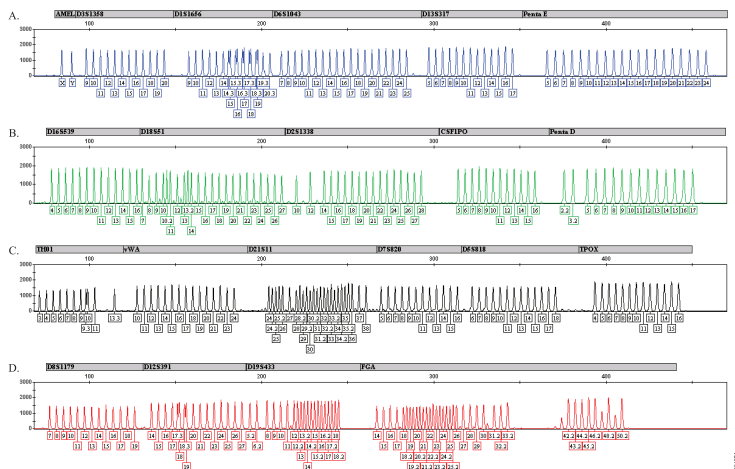


图23. PowerPlex®21等位基因Ladder混合液。在Applied Biosystems 3130型遗传分析仪上，使用3kV电压、5秒进样模式对PowerPlex®21等位基因Ladder混合液进行电泳检测。电泳结果使用GeneMapper®ID软件(3.2版本)和PowerPlex®21的Panels和Bins文件进行分析。**PanelA.** 荧光素(FL)标记的等位基因成分及全部等位基因分型。**PanelB.** JOE-标记的等位基因成分及全部等位基因分型。**PanelC.** TMR-标记的等位基因成分及全部等位基因分型。**PanelD.** CXR-标记的等位基因成分及全部等位基因分型。

非特异峰和阴影带

阴影带是在STR分析中经常出现的扩增非特异产物，其长度通常比真实的等位基因短一个重复序列，偶尔也会出现比真实的等位基因短两个重复序列或者长一个重复序列。通常情况下，等位基因重复序列的重复次数越多，出现阴影带的可能性就越大。对于同一个位点，引物对设计不同，产生的阴影带的形状和强度会有略微的差别。

GeneMapper®ID软件(3.2版本)PowerPlex®21的Panels文件中对于位点的特定滤过设置(locus-specific filtering)和GeneMapper®ID-X软件PowerPlex®21的Stutter文件中对于位点的特定滤过设置(locus-specific filtering)，其中每个位点都使用了平均值加3个标准差。

除了阴影带以外，PowerPlex®21系统的一些基因座中也会出现其他的杂峰。通常会在比基因座多或少2个碱基的位置发现低浓度产物，比如D1S1656、D6S1043、D13S317、vWA、D21S11、D7S820、D5S818、D12S391和D19S433。

性别位点有时会出现比其少一个碱基的杂峰。在蓝色荧光通道的66-69个碱基的位置、绿色荧光通道的60-62个碱基和82-83个碱基的位置、黄色荧光通道的60-67个碱基及红色通道的58-65个碱基和76-77个碱基可能会出现杂峰。

进行种属特异性测试时，我们检测到猪的DNA在364-366个bp之间会产生扩增片段(在CSF1PO和PentaD交接处)。

7. 问题及解决方案

对于此处没有提及的问题，请联系您当地的Promega分公司(办事处)或代理商。联系信息请登陆：www.promega.com, E-mail: genetic@promega.com

7.A. 扩增及片段分析

本节列出了日常扩增及检测中可能遇到的问题及解决方案。有关直接扩增的问题，请参见章节7.B和7.C。

问题	原因	参考建议
等位基因缺失或峰值过低	模板DNA不纯	模板用量不足，这个原因极少遇见。由于提取程序及样本来源的差异，DNA样本中可能存在抑制物。
	模板量不足	请使用推荐模板DNA量 通过毛细管电泳对低拷贝模板(LCN)进行分析时，可在进样时减少竞争性带电粒子，以获得更好的结果。这可通过对扩增产物进行纯化、除盐，使用低电导率的甲酰胺或者减少WEN ILS500的用量等方法。这些方法需要通过本实验室的有效验证。
	使用前未将PowerPlex®21 5x Master Mix充分混匀	将5x Master Mix加到PCR扩增混合液里之前应将其漩涡振荡5-10秒以便充分混匀。
	反应管底中有气泡	扩增前请用移液器或离心将管中气泡去除
	盐浓度过高或PH值改变	如果DNA模板保存在TE缓冲液中，TE的PH值不是8.0或含有过高浓度的EDTA，则DNA模板溶液的体积不能超过总反应体积的20%。DNA样本中含有过多的K ⁺ ,Na ⁺ ,Mg ²⁺ 或EDTA，会抑制PCR反应。PH值的改变同样会影响扩增反应，建议将DNA保存在TE ⁻⁴ 缓冲液中(10mM Tris-HCL,0.1mM)或无核酸酶水中。
	反应体积过小	系统优化的终体积为25µl，减小反应体积可能会使扩增效果不好。
	2800M阳性对照保存不当	
	热循环仪、平板或离心管问题	章节4中介绍了热循环仪设置程序。我们没有测试过其他品牌的反应管、反应板及热循环仪。必要的话，需要矫正热循环仪的加热模块。
	引物浓度过低	使用推荐的引物浓度。使用前，须将PowerPlex®21 5x Primer Pair充分振荡15秒。
	电泳进样不好(WEN ILS500峰值也低)	重新进样，检查注射器有无漏胶，检查激光源。

问题	原因	参考建议
等位基因缺失或峰值过低	样本变性不完全	在电泳之前，按照建议的时间将样本充分变性，然后迅速置于碎冰上充分冷却，及时上样电泳。不要将样品放在设置为4℃的热循环仪中进行冷却，这可能会导致DNA复性而出现非特异性带。
	所用的甲酰胺的质量不好	分析样本时，只可使用Hi-Di™甲酰胺。
一个或多个通道中有额外的杂峰出现	被另外一种模板DNA或先前存在的扩增产物污染。	可能存在交叉污染，应该使用防回吸取样枪头，并及时更换手套。
	样品变性不完全	在电泳之前，按照建议的时间将样本充分变性，并迅速置于碎冰上充分冷却，然后及时上样电泳。不要将热循环仪设置成4℃用以冷却样品。否则会导致DNA复性而产生杂峰。
	STR扩增的非特异峰	STR系统的PCR扩增通常会有一些比等位基因少一个碱基的非特异峰。这是由于3'末端加A不完全造成的。 <ul style="list-style-type: none"> 在热循环完成后，应确保60℃的20Min充分延伸。(参考章节4.) 减少循环数。 塑料制品可在扩增中充分进行热量传递，从而避免完全的腺苷化。增加最终延伸时间。
	STR扩增的非特异峰	扩增过量的纯化DNA，可能会出现较多的杂峰。请扩增推荐的模板DNA量。欲知有关阴影峰和杂峰更多的信息，请参照章节6.L。
	杂峰	将扩增产物置于4℃，或短时间的过夜甚至更久，可能会增加某些杂峰的信号强度(参照表5)，我们建议将扩增产物储存在-20℃。
	在毛细管电泳时双链DNA迁移速率要高于单链DNA，在主峰的前面出现阴影峰，尤其是在杂合体中，在距离两个主峰同等距离处会相应地出现杂峰。这种现象显示DNA变性不完全或者取样后组分复性。	
	毛细管电泳相关的非特异产物(尖刺峰)	微小的电压变化或尿素结晶通过激光源时会导致“尖刺峰”或意外峰。尖刺峰有时只在一个颜色内出现，但通常会在多个颜色内出现，这样会容易鉴别。需要重新电泳确认。
激活了错误的G5光谱	重新对样品进行电泳，并确保激活PowerPlex 5C进行的光谱校正。可参考章节5中仪器准备的说明书。	

问题	原因	参考建议
一个或多个通道中有额外的杂峰出现	拉升或渗透	当峰值过高或应用与样本的Matrix质量不高或不正确时, 就会产生拉升现象。 <ul style="list-style-type: none"> • 需要进行一次新的光谱校正, 然后重新电泳样品。 • 不同的仪器灵敏度会有所差异, 需要优化进样条件。请参阅章节5。
	毛细管电泳相关的非特异产峰(污染)	如果用于仪器的水或用于稀释10x 遗传分析缓冲液的水被污染了, 会在蓝色和绿色荧光中产生非特异峰。使用高压灭菌水、更换电极小瓶、清洗缓冲液容器。
		利用新鲜的甲酰胺重新准备样品。将扩增产物长时间保存在甲酰胺里会导致其降解。
	CE胶的问题	CE聚合胶超过保质期, 或者将聚合胶在室温放置时间超过一个星期。
		按照用户使用手册推荐的操作, 每天或每周进行仪器的维护。
等位基因Ladder与样本不相同	等位基因Ladder与引物对混合物不匹配	确保等位基因Ladder与引物对混合物来自同一个试剂盒
	所用甲酰胺的质量不好	分析样本时, 只可使用Hi-Di™甲酰胺。
		确保等位基因Ladder与样本在仪器的同一个run中进行
	毛细管电泳多次后, 会发生样本的轻度偏移	这可能是由于多次电泳后, 毛细管柱温会发生改变。利用不同时间电泳的Ladder分析样品。
	等位基因Ladder电泳质量不佳	每次电泳中应包含多个Ladder
峰高不均衡	DNA过量	如果扩增的模板量大于0.5ng时, 会引起小基因座的产量远远高于大基因座。可减少循环数。
	DNA样本降解	DNA样本降解, 大基因座产量减少。可重新纯化DNA。
	DNA模板量不足	使用推荐量的模板DNA, 当扩增时模板量过低, 会产生随机效应。
	反应体积过小	系统优化的终体积为25μl, 可消除来自DNA样品的抑制效应。减小反应体积可能会使扩增效果不好。
	反应混合物混匀问题	使用前应将5x Primer Pair Mix及5x Master Mix充分解冻, 并振荡混匀15秒。震荡混匀后不要对5x Primer Pair Mix及5x Master Mix离心。定期校准热循环仪及加样器。

问题	原因	参考建议
峰高不均衡	章节4中准备的PCR扩增混合液没有充分混匀	将PCR扩增混合液分装到反应管或平板之前，应将其漩涡振荡5-10秒。
	DNA模板不纯	案件现场的检材可能存在抑制物，会导致位点丢失或峰高不平衡。

7.B. 对DNA采集卡的直接扩增

本章节提供了直接扩增DNA采集卡时可能遇到的问题及解决方案。对于日常扩增及检测遇见的问题，请参见章节7.A。

问题	原因	参考建议
等位基因缺失或峰值过低	反应体积过小	系统优化的终体积为25 μ l，以避免FTA [®] 卡和PunchSolution组份中的抑制物。减小反应体积可能会使扩增效果不好，尤其是直接扩增FTA [®] 卡上的DNA时。
	样本沉寂较差	供体细胞剥离和收集质量较差。增加循环数。
	转移到FTA卡上的DNA质量差	在卡上不同的地方打孔。增加直接扩增的循环次数可能会提高低的峰值高度。
	反应液中DNA量过高	应使用1到2个1.2mm的FTA [®] 卡片。请严格按照操作手册上的建议将样本转移到FTA卡上。对于储存卡而言，反应体积降到25 μ l以下否则可能导致扩增失败。
	扩增液中含有抑制物	当使用多于1片含有全血样本的FTA [®] 卡片时，扩增会受抑制。只使用1个含有全血样本的FTA [®] 卡片进行直接扩增。
	扩增非FTA卡样本时，加入了携带活性蛋白质的PunchSolution组份	确保加热块设置温度为70 $^{\circ}$ C，样本孵育30分钟。较短时间的孵育可能会导致PunchSolution [™] 组份活性不完全。但我公司未测试更长时间的孵育效果。
	PunchSolution [™] 组份活性丧失	2-10 $^{\circ}$ C下解冻PunchSolution [™] 组份。不要将此试剂储存在有温度变化的冰箱中。不要使产品结冰。避免反复冻融产品，否则会导致活性丧失。
阳性对照反应峰值过低或缺失	<p>确保适量的2800M Control DNA 加入到反应液中。我们建议25μl扩增液中，2800M Control DNA的使用量为10ng。</p> <ul style="list-style-type: none"> 不要向阳性对照反应液中加入空白的打孔片，否则会抑制2800M Control DNA的扩增。 应根据本实验室的条件及热循环仪的状态优化2800M Control DNA的用量。减少循环数时，2800M Control DNA的使用量可为5-10ng。 	

问题	原因	参考建议
2800M Control DNA储存条件不合适		
在一个或多个通道中有额外的峰出现	打孔样本可能被污染	两次取样间应在空白卡片中多打一孔。用1-2个空白卡片设置作为一个阴性对照反应。
	STR扩增的非特异峰	<p>用大于20ng模板进行扩增时，可能会出现较多的非特异峰。请使用推荐的打孔样本的规格及数量。欲知阴影带及非特异性带更多的信息可参考章节6.L。</p> <p>STR系统的PCR扩增通常会有一些比等位基因少一个碱基的非特异峰。这是由于3'末端加A不完全造成的。</p> <ul style="list-style-type: none"> 在热循环完成后，应确保60°C充分延伸20Min (参考章节4.B)。 减少循环数 增加最终的再延伸时间
峰高不平衡	DNA过量	<p>如果扩增的模板量大于20ng时，会引起小基因座的产量远远高于大基因座。</p> <ul style="list-style-type: none"> 应用1-2片1.2mm含有口腔样本的储存卡片，或者1片1.2mm含有全血样本的储存卡片。按照操作说明上的建议将样品转移到储存卡上。 减少循环数
	反应体积小	系统优化的终体积为25 μ l，可消除来自FTA [®] 卡或PunchSolution组份的抑制效应。减小反应体积可能会使扩增效果不好。扩增的全血储存卡片过多，可能导致抑制扩增。建议扩增1片1.2mm直径的全血储存卡片。
	未进行裂解步骤，就是用了Bode 口腔DNA收集装置	对于口腔DNA收集装置上的口腔样本，我们建议在将样本加入到扩增液之前，使用PunchSolution组份裂解样本。
样本间峰高差异太大	打孔样本所包含的个体细胞存在的差异会引起样本之间峰高的差异。	PunchSolution [™] 试剂盒可增加样本上旭要扩增DNA的量，但并不能定量已存在的DNA。

7.C 对棉签DNA的直接扩增

本章节例举了直接扩增棉签时遇见的问题及解决方案，此类棉签并用SwabSolution™试剂盒进行了预处理。欲了解更多扩增和检测中常遇见的问题，请参考7.A部分



问题	原因	参考建议
等位基因缺失或峰值过低	样本沉寂较差	供体细胞剥离和收集质量较差。增加循环数。
	SwabSolution™组份活性丧失	37℃的水浴锅中解冻SwabSolution™组份,然后充分混匀。将试剂储存到2-10℃中。不要将此试剂储存在有温度变化的冰箱门上。不要使产品再次结冰。避免反复冻融产品,否则会导致活性丧失。
	扩增非FTA卡样本时加入了有活性的SwabSolution™组份	确保加热块设置温度为70℃(如果使用了2.2ml的深孔板,设置温度为90℃),样本孵育30分钟。较短时间的孵育可能会导致SwabSolution™组份活性不完全。不要将温度设置为70℃孵化离心管和反应板。热量传递不佳可能导致孵化效果较差。只有加热模块可保证热量传递质量。我们测试了30Min的孵化效果与60Min的没有什么区别。
阳性对照反应峰值过低或缺失	阳性对照扩增失败	确保适量的2800M Control DNA加入到反应液中。由于棉签提取液的使用量,而减少了循环数,那么需要增加2800M Control DNA的扩增量,才能获得完整的图谱。我们建议25μl扩增液中,2800M Control DNA的使用量为5ng。如果增加了循环数,应相应地减少2800M Control DNA的扩增量,或者增加了循环数,也应相应减少2800M Control DNA的扩增量。增加或减少一个循环数,应相应地将2800M Control DNA的扩增量减少或增加两倍。
一个或多个通道中存在额外的杂峰	棉签提取液被污染	在处理样本时,应加入一个空白的棉签作为阴性对照。
	STR扩增的非特异性带	扩增大于20ng的模板时,容易出现更多的非特异性带。25μl体系扩增时,加入2μl提取液,加入过多会使DNA过量。如峰值太高,可减少扩增时加入的提取液的量,或降低循环数。可参考章节6.L了解更多有关影子带或杂带的信息。

问题	原因	参考建议
一个或多个通道中存在额外的杂峰	STR扩增的非特异性带	<p>STR的扩增通常会产生一些比等位基因少一个碱基的非特异峰。这是由于3'末端加A不完全造成的。</p> <ul style="list-style-type: none"> 在热循环完成后，应确保60℃充分延伸20Min(参考章节4.C)。 在25μl反应体系中加入2μl棉签提取液。加入超过推荐量的提取液会导致加A不完全。 减少循环数。 增加延伸时间。
	使用推荐的循环数扩增了过量的DNA导致毛细管电泳超负荷	除了信号渗透之外，如果毛细管中DNA过量，导致DNA很难保持在单链状态。双链DNA的迁移速率比单链DNA的快，因此毛细管电泳时，主峰前面会形成阴影峰。如果是杂合体，会出现与两个单链的等位基因钱相距同等距离的两个阴影峰。
峰高不平衡	扩增反应液中含有过量的DNA	过量的DNA会导致一个荧光通道中位点之间的不平衡。比如小片段位点的峰高明显高于大片段位点的峰高(滑坡效应)。扩增少量的棉签提取液，或者减少循环数。
	扩增反应液中的棉签提取液携带了活性的蛋白质	较大片段的位点易受蛋白质的影响，相对小片段位点更易丢失。确保加热模块设置温度为70℃(如果使用了2.2ml的深孔板，设置温度为90℃)，样本孵育30分钟。较短时间的孵育可能会导致SwabSolution™组份活性不完全。不要将温度设置为70℃孵化离心管和反应板。热量传递不佳可能导致孵化效果较差。只有加热模块可保证热量传递质量。
	SwabSolution™组份活性丧失	37℃的水浴锅中解冻SwabSolution™组份,然后充分混匀。将试剂储存到2-10℃中。不要将此试剂储存在有温度变化的冰箱门上。不要使产品再次结冰。避免反复冻融产品，否则会导致活性丧失。
样本之间的峰高差异性大	口腔拭子收集的个体细胞存在的差异会引起样本之间峰高的差异。	不同的棉签提取液之间会出现峰高差异。提取可最大量获得棉签上的DNA，但无法对获得的DNA进行定量。如果差异太大，应用以荧光检测双链DNA方法或q-PCR定量方法进行定量。定量可标准化加入的DNA模板，减少各信号之间的差异。

7.D. GeneMapper® ID-X分析软件

问题	原因	参考建议
阴影峰没有被过滤掉	当导入Panel及Bin文件时没有导入Stutter文件 在Analysis Method Allele按键中没有定义阴影峰的距离	
Project中的样品不分析	Analysis Requirement Summary 视窗没有激活，没有出现分析要求(Analysis Requirement)。	在Option菜单中打开Analysis Requirement Summary视窗，选择正确的Analysis Requirement，然后进行分析。
无法看到标签中的编辑显示器	如要对Project进行编辑，首先需保存Project。关闭Plot View视窗，回到GeneMapper® ID-X的主窗口，保存Project。重新打开Plot View视窗，查看标签中的编辑窗格。	
对于一些位点，Marker Header Bar是灰色的	当编辑某个位点时，Quality Flags及Marker Header Bar会自动转换为灰色，忽略Plot视窗中的GQ设置，可将某个位点的GQ及Marker header bar转换为绿色。	
等位基因没有命名	利用GeneMapper® ID软件分析样本时，至少需要定义一个等位基因Ladder。	
	未定义足够数量的WEN ILS500的片段	确保WEN ILS500至少有一个片段小于样本的最小基因座，并且至少有一个片段大于样本的最大基因座。否则的话，等位基因Ladder会在等位基因Ladder质量检测中无法通过。
	电泳时间过短，WEN ILS500较大的片段未被仪器收集	在电泳过程中，没有检测到全部的WEN ILS500片段标准。 <ul style="list-style-type: none"> • 使用样本中的内标片段标准创建新的片段标准 • 延长电泳时间，重新电泳样品
	分析时所用的等位基因Ladder质量较差	确保分析样品时所用的等位基因Ladder是高质量的。
出现Ladder外的等位基因座	使用的等位基因Ladder与样本来源于不同的电泳组	使用同时电泳的等位基因Ladder重新分析样品。GeneMapper® ID-X软件要求样本及等位基因Ladder保存在同一个文件夹，确保等位基因Ladder与样本在同一个文件夹中。重新创建一个Project程序，重新分析。请参阅章节6.D或6.E。
	分析所用的Panel文件与STR系统不匹配	选择与扩增时使用的STR系统相对应的Panel文件。
	等位基因Ladder未定义	在Sample Type一栏中，等位基因Ladder没有标注为“Allelic Ladder”。
	没有正确标注样本中的内标片段	需对样本中的长度片段标准进行手动定义。

问题	原因	参考建议	
	分析时所用的等位基因Ladder质量较差	确保分析样品时所用的等位基因Ladder是高质量的。	
	使用的等位基因Ladder与样本来源于不同的电泳组	使用同时电泳的等位基因Ladder重新分析样品。	
片段标准命名不准确	在章节6.E中所选择的部分区域的数据起始点不准确	在分析模式中调节数据起始点，或者使用全片段分析模式	
	在片段标准中出现额外峰	打开Size Match Editor，点亮额外峰，选择“编辑(edit)”，然后点击“删除片段标记(delete size label)，最后选择“自动调整片段(auto adjust sizes)”。	
	电泳时间过短，WEN ILS500较大的片段未被仪器收集	在电泳过程中，没有检测到全部的已定义的WEN ILS500片段标准。	利用样品中的片段标准创建一个新的片段标准。
			延长电泳时间，重新电泳样品。
片段标准的峰值缺失	峰值低于阈值	在分析模式中降低橙色荧光通道的峰值阈值	
	某些内标峰质量差	直接对样品定义片段标准，跳过这些峰。	
基准明显升高	光谱校正质量较差	进行新的光谱校正后，重新电泳样品。	
	错误的G5光谱被激活	重新电泳样品，确保PowerPlex 5C G5光谱的设置为G5，可参阅章节5中的仪器准备的说明。	

7.E. GeneMapper® ID分析软件

症状	原因	参考建议
等位基因未命名	GeneMapper® ID分析软件	当使用GeneMapper® ID软件分析样品时，分析参数(analysis parameters)和片段标准(size standard)必须全部以“Basic or Advanced”为分析模式(analysis type)。如果设置与此不同，就会产生错误信息。 当使用GeneMapper® ID软件分析样品时，至少定义一个等位基因Ladder
	标注的WEN ILS500片段数量不够	确保WEN ILS500至少有一个片段小于样本的最小基因座，并且至少有一个片段大于样本的最大基因座。
	电泳时间太短，仪器未收集到ILS500较大的片段	在电泳过程中，没有检测到全部的已定义的WEN ILS500片段标准。 • 使用样本中的内标片段标准创建新的片段标准 • 延长电泳时间，重新电泳样品

症状	原因	参考建议
Ladder外的等位基因座	使用的等位基因Ladder与样本来源于不同的电泳过程	使用同时电泳的等位基因Ladder重新分析样品
	GeneMapper® ID软件要求样本及等位基因Ladder保存于同一个文件夹	确保等位基因Ladder与样本在同一个文件夹中，重新创建一个Project程序，重新分析。请参阅章节6.1或6.J。
	所用的Panel文件与STR系统不匹配	选择与扩增时使用的STR系统相对应的Panel文件。
	等位基因Ladder	在样本类型 (Sample Type) 一栏中，对于等位基因Ladder没有标注为“Allelic Ladder”。
	分析模式中选择了错误的分析类型	确保选择的是HID分析类型。
	没有正确定义样本中的内标片段	需对样本中的长度片段标准进行手动定义。
片段标准命名不准确	在章节6.1中所选择的部分区域的数据起始点不准确	在分析模式中调节数据起始点，或者使用全片段分析模式
	在片段标准中出现额外峰	打开片段匹配编辑器，点亮额外峰，选择“编辑 (edit)”，然后点击“删除片段标记 (delete size label)”，最后选择“自动调整片段 (auto adjust sizes)”。
	电泳时间过短，WEN ILS500较大的片段未被仪器收集	在电泳过程中，没有检测到全部的已定义的WEN ILS500片段标准。 <ul style="list-style-type: none"> • 使用样本中的内标片段标准创建新的片段标准 • 延长电泳时间，重新电泳样品
片段标准的峰值缺失	峰值低于阈值	在分析模式中降低橙色荧光通道的阈值
	某些内标峰质量差	直接对样品定义片段标准，跳过这些峰。
错误信息 “Either panel size standard ,or analysis method is invalid”	片段标准与分析方法未在统一模式下 (Classic 或Basic or Advanced)	确保两个文件设置在同一个模式中，要么“Classic”，要么“Basic or Advanced”。
基因座未命名但是没有显示错误信息	没有对样本选择Panels	在Panel一栏中，选择与使用的STR系统相同的Panel选项
	没有选择size standard	在Size Standard一列中，选择合适的Size Standard
	片段标准定义错误，或片段峰丢失	重新定义片段标准，仅包含样本中出现峰的区域。过早的终止电泳或电泳时间过短都会引起Ladder的大片段丢失。这些会在分析时的片段质量 (SQ) 处显示红色标记，并且将不会对基因座命名。

症状	原因	参考建议
错误信息 “Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit”	分析模式中的Bin被删除	在GeneMapper Manager中, 点击Analysis Method按键, 打开分析模式, 点击Allele按键, 选择相应的Bin设置。
	在分析模式等位基因处选择了错误的Bin	如图19所示, 选择相应正确的Bin
基线明显升高	ABIPRISM3100、3100-Avant遗传分析仪及Applied Biosystems3130、3130xl、3500及3500xl遗传分析仪光谱校正质量较差。	设置新的光谱校正, 重新电泳样品。
	分析模式用的是经典模式(Classic mode)	利用Classic mode分析样品会产生比用Basic or Advanced模式更多的噪音。推荐使用Advanced分析模式与片段标准。
尝试输入Panel及Bin文件时出现错误信息 “Unable to save panel data.java. Exception: ORA-00001: unique constraint (IFA.CKP-NNN)violated	错误的光谱G5	重新电泳样品, 确保PowerPlex 5C G5光谱的设置G5, 可参阅章节5中仪器准备的说明书。
	Panel及Bin文件设置不同产生冲突	确保bin文件安装正确, 如果不是, 应删除Panel及Bin文件, 按照不同的指令重新导入Panel及Bin文件。
Allelic Ladder峰标注为off-ladder	没有使用GeneMapper®ID软件, 或使用了微卫星(microsatellite)分析设置, 而没有使用HID分析设置	没有使用GeneMapper软件, 或没有使用HID分析设置, 而使用了微卫星分析设置。GeneMapper软件没有使用与GeneMapper®ID软件相同的统计方法, 也不能利用等位基因Ladder校正片段大小。Promega公司建议使用GeneMapper®软件分析PowerPlex®反应。如果使用的是GeneMapper® ID软件, 3.2版本, 应确保分析方法设置为HID。这可以在GeneMapper Manager中打开分析方法核实, 然后点击General按键。分析类型不可改变。如果分析方法不是HID, 则将其删除, 创建一个新的分析模式。

8. 参考文献

1. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: Polymorphic loci, detection systems, and population genetics. In: *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, Promega Corporation, 31–52.
2. Edwards, A. *et al.* (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 746–56.
3. Edwards, A. *et al.* (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 241–53.
4. Warne, D. *et al.* (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human β -actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 19, 6980.
5. Ausubel, F.M. *et al.* (1996) Unit 15: The polymerase chain reaction. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley and Sons, NY.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
7. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (1989) Erlich, H.A., ed., Stockton Press, New York, NY.
8. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (1990) Innis, M.A. *et al.*, eds., Academic Press, San Diego, CA.
9. Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, London.
10. Presley, L.A. *et al.* (1992) The implementation of the polymerase chain reaction (PCR) HLA DQ alpha typing by the FBI laboratory. In: *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, Promega Corporation, 245–69.
11. Hartmann, J.M. *et al.* (1991) Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest* 18, 44–75.
12. *Internal Validation of STR Systems Reference Manual #GE053*, Promega Corporation.
13. Kline, M.C. *et al.* (2005) Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J. Forensic Sci.* 50, 571–8.
14. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4, 203–21.
15. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 211–5.
16. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* 5, 312–7.
17. Magnuson, V.L. *et al.* (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of

- adenine by Taq DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* 21, 700–9.
18. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24, 2807–12.
 19. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* 111, 267–72.
 20. Butler, J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 51, 253–65.
 21. Hill, C.R. *et al.* (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.* 53, 73–80.
 22. Lu, D.J., Liu, Q.L and Zhao, H. (2011) Genetic data of nine non-CODIS STRs in Chinese Han population from Guangdong Province, Southern China. *Int. J. Legal Med.* 125, 133–7.
 23. Bar, W. *et al.* (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* 110, 175–6.
 24. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* 87, 185–92.
 25. Fregeau, C.J. *et al.* (1995) Characterization of human lymphoid cell lines GM9947 and GM9948 as intra- and interlaboratory reference standards for DNA typing. *Genomics* 28, 184–97.
 26. Mandrekar, P.V., Krenke, B.E. and Tereba, A. (2001) DNA IQTM: The intelligent way to purify DNA. *Profiles in DNA* 4(3), 16.
 27. Krenke, B.E. *et al.* (2005) Development of a novel, fluorescent, two-primer approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA* 8(1), 3–5.

9. 附录

9.A. 使用PowerPlex® 21系统的位点的优势

PowerPlex® 21系统包括的位点(表4和5所示), 可以满足法庭科学实验室中的中国人群常规样本基因分型的需求。PowerPlex® 21系统可以在一次反应中扩增中国法庭科学实验室所需的全部常规位点。表6列出了常用的标准DNA模板使用PowerPlex® 21系统检测得到的等位基因分型。

表4. PowerPlex® 21系统特异位点信息

STR位点	荧光标记	染色体位置 ¹	重复序列 ² 5' → 3'
Amelogenin	Fluorescein	Xp22.1–22.3 and Y	NA
D3S1358	Fluorescein	3p21.31 (45.557Mb)	TCTA Complex
D1S1656	Fluorescein	1q42 (228.972Mb)	TAGA Complex
D6S1043	Fluorescein	6q15 (92.449Mb)	AGAT
D13S317	Fluorescein	13q31.1 (81.62Mb)	TATC
Penta E	Fluorescein	15q26.2 (95.175Mb)	AAAGA
D16S539	JOE	16q24.1 (84.944Mb)	GATA
D18S51	JOE	18q21.33 (59.1Mb)	AGAA (19)
D2S1338	JOE	2q35 (218.705Mb)	TGCC/TTCC
CSF1PO	JOE	5q33.1 (149.436Mb)	AGAT
Penta D	JOE	21q22.3 (43.88Mb)	AAAGA
TH01	TMR-ET	11p15.5 (2.149Mb)	AATG (19)
vWA	TMR-ET	12p13.31 (5.963Mb)	TCTA Complex (19)
D21S11	TMR-ET	21q21.1 (19.476Mb)	TCTA Complex (19)
D7S820	TMR-ET	7q21.11 (83.433Mb)	GATA
D5S818	TMR-ET	5q23.2 (123.139Mb)	AGAT
TPOX	TMR-ET	2p25.3 (1.472Mb)	AATG
D8S1179	CXR-ET	8q24.13 (125.976Mb)	TCTA Complex (19)
D12S391	CXR-ET	12p12 (12.341Mb)	AGAT/AGAC Complex
D19S433	CXR-ET	19q12 (35.109Mb)	AAGG Complex
FGA	CXR-ET	4q28 (155.866Mb)	TTTC Complex (19)

¹有关这些位点在染色体位置上的信息可在第20、21和22篇文献中找到, 也可登陆www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/chrom.htm

²国际法庭科学协会(ISFH)DNA委员会1997年8月报告(23, 24)指出: 1)对于编码基因区内的STR位点, 可使用编码链, 并且可以使用重复序列模体的第一个5'端核酸定义该重复模体; 2)对于未与编码基因结合的STR位点, 可使用数据库的首次录入或原始资料描述定义。

³性别位点不是短串联重复序列, X染色体特异带长度为89bp, Y染色体特异带长度为95bp。

表5. PowerPlex® 21系统等位基因信息

STR位点	荧光标记	Allelic Ladder组份 长度范围 ^{1, 2} (bp)	Allelic Ladder 组分重复次数 ³
Amelogenin	Fluorescein	89, 95	X, Y
D3S1358	Fluorescein	103-147	9-20
D1S1656	Fluorescein	161-208	9-14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
D6S1043	Fluorescein	215-287	7-25
D13S317	Fluorescein	302-350	5-17
Penta E	Fluorescein	371-466	5-24
D16S539	JOE	84-132	4-16
D18S51	JOE	134-214	7-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27
D2S1338	JOE	224-296	10, 12, 14-28
CSF1PO	JOE	318-362	5-16
Penta D	JOE	377-450	2.2, 3.2, 5-17
TH01	TMR-ET	72-115	3-9, 9.3, 10-11, 13.3
vWA	TMR-ET	127-183	10-24
D21S11	TMR-ET	203-259	24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38
D7S820	TMR-ET	269-313	5-16
D5S818	TMR-ET	321-369	6-18
TPOX	TMR-ET	393-441	4-16
D8S1179	CXR-ET	76-124	7-19
D12S391	CXR-ET	133-185	14-17, 17.3, 18, 18.3, 19-27
D19S433	CXR-ET	193-245	5.2, 6.2, 8-12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2
FGA	CXR-ET	265-411	14-18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26-30, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 48.2, 50.2

¹Allelic Ladder中的每个等位基因的长度都已通过序列分析证实。

²当使用内标如WEN ILS500时，得出的Allelic Ladder组份的片段大小可能会与上面列表有所不同。这可能是由于Allelic Ladder组份与内标组份序列不同导致迁移率不同引起的。荧光染料的标记也会影响等位基因的迁移。

³对于微变异体的最新目录，请参照公布在美国国家标注技术协会(U.S. National Institute of Standards and Technology, NIST)网站www.cstl.nist.gov/div831/strbase/上的“变异等位基因报告”(Variant Allele Report)。

⁴性别位点不是短串联重复序列，X染色体特异带长度为89bp，Y染色体特异带长度为95bp。

表6 PowerPlex[®] 21系统在标准DNA模板的等位基因分型

STR位点	标准DNA模板 ¹		
	2800M	9947A	9948
Amelogenin	X, Y	X, X	X, Y
D3S1358	17,18	14,15	15,17
D1S1656	12,13	18.3, 18.3	14,17
D6S1043	12,20	12,18	12,12
D13S317	9,11	11,11	11,11
Penta E	7,14	12,13	11,11
D16S539	9,13	11,12	11,11
D18S51	16,18	15,19	15,18
D2S1338	22,25	19,23	23,23
CSF1PO	12,12	10,12	10,11
Penta D	12,13	12,12	8,12
TH01	6,9.3	8,9.3	6,9.3
vWA	16,19	17,18	17,17
D21S11	29,31.2	30,30	29,30
D7S820	8,11	10,11	11,11
D5S818	12,12	11,11	11,13
TPOX	11,11	8,8	8,9
D8S1179	14,15	13,13	12,13
D12S391	18,23	18,20	18,24
D19S433	13,14	14,15	13,14
FGA	20,23	23,24	24,26

¹有关9947A和9948品系的信息可登陆以下网站查询:

http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM09947和http://ccr.coriell.org/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM09948

使用9947A和9948 DNA 作为标准DNA模板的信息可参阅第25篇文献。

我们精选引物以避免或尽量减少杂峰，包括与DNA聚合酶结合的杂峰，如重复序列的滑动和终止核苷酸的添加(14,15)。有时被称作“n-4 bands”，“影子带”或“阴影峰”的重复序列的滑动，是在DNA扩增、体细胞DNA突变或两者都有时重复序列的丢失引起的。检测到的杂峰量主要取决于扩增的位点和DNA序列。

末端核苷酸添加(16,17)通常发生在非校正热稳定性DNA聚合酶以独立模板的方式，在扩增的DNA片段3' 末端加一个核苷酸，一般是腺苷酸。发生这一现象的概率取决于不同的引物序列。因此有时能检测到比预期少一个碱基的假带(例如，无末端添加)。我们将引物序列做了修饰，并在扩增程序最后加入了60°C的延伸步骤(18)，为在推荐用量的DNA模板上完成必要的末端核苷酸添加提供条件。

9.B. DNA的提取和定量方法及自动化操作

Promega公司提供STR扩增前样本准备、DNA纯化和DNA定量所需的全套试剂和自动化方法。

SwabSolution™试剂盒，定制产品(目录号，DC8271)。包括使用PowerPlex®系统分析前从棉签中快速纯化DNA的全套试剂。它可以裂解棉签上的细胞，将DNA释放到提取液中，扩增时只需将很小量的提取液加入到PowerPlex®反应液中即可。

DNA IQ™系统(目录号，DC6700)是专门用于法庭科学及亲子鉴定中DNA样本的提取及定量(26)。该系统使用顺磁性颗粒技术，为STR分析简便有效地制备干净的样本，并可从斑迹、液态样本(如血液或溶液)中提取DNA。DNA IQ™系统树脂可去除条件样本中经常存在的PCR抑制物及污染物。当DNA模板量大时，使用DNA IQ™系统可制备得到恒定量的DNA。此系统可用于从日常样本，如口腔拭子、FTA®卡的斑迹以及血液中定量提取DNA。此外，还可从组织、性犯罪案件混合检材以及其它载体的斑迹中提取DNA，DNA IQ™系统的提取效果已通过使用PowerPlex®系统检验得到了证实。订购信息请参阅章节9.E。

Plexor® HY系统(目录号，DC1000)可用于人类特异DNA的定量(27)。Plexor® HY系统使用实时定量PCR反应，可在一个反应中同时测定人类总DNA和男性特异DNA的浓度。另外，Plexor® HY系统通过扩增后熔解曲线分析来确定阳性结果，并且通过PCR内对照(Internal PCR Control, IPC)来确定阴性结果。更多的订购信息可参考章节9.E。

有关使用Identity Automation™解决方案在自动化工作站上使用Promega产品的信息，可咨询Promega的当地分公司或经销商(联系信息可登陆www.promega.com/support/worldwide-contacts/查询)，邮箱：genetic@promega.com或浏览网站www.promega.com/idautomation/。

9.C. 内标WEN ILS500

内标WEN ILS500包含21个DNA片段，长度分别为60、65、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475和500bp(图24所示)。每一条片段都用WEN标记，可以在PowerPlex® 21扩增产物

存在的情况下，以第5种颜色进行单独检测。WEN ILS500设计用于每一根毛细管进样，以提高应用PowerPlex[®] 21系统分析时的精确度。WEN ILS500的配制及使用方法请参阅章节5。

注意：当扩增片段大于475bp时次内标将不适用“Local Southern”的方法，对于Penta E位点，等位基因标记大于24将被标记为“OL”。

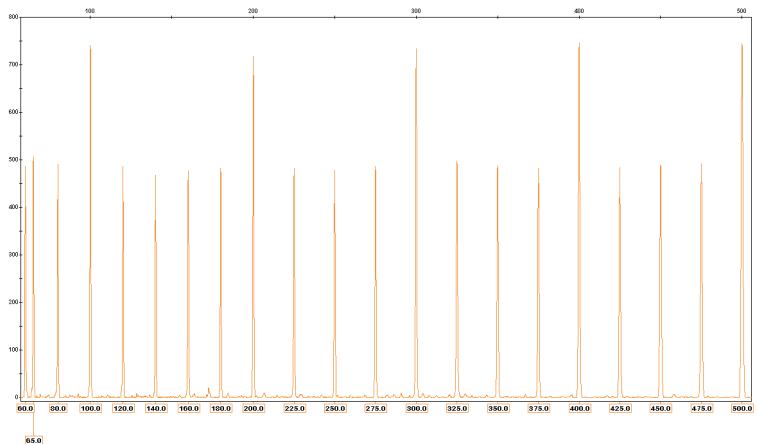


图24.内标 WEN ILS500。此电泳图谱显示了内标WEN ILS500的片段。

9.D. 缓冲液和试剂的组分

TE⁻⁴ 缓冲液(10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA [pH 8.0])

1.21g Tris base

0.037g EDTA (Na₂EDTA·2H₂O)

用900ml去离子水溶解Tris base及EDTA。用HCl调整pH为8.0。并加适量的去离子水将终体积调至为1L。

含有20μg/ml糖原的TE⁻⁴缓冲液

1.21g Tris base

0.037g EDTA (Na₂EDTA·2H₂O)

20μg/ml糖原

用900ml去离子水溶解Tris base及EDTA。用HCl调整pH为8.0。加糖原。并加适

量的去离子水将终体积调至为1L。

9.E. 相关的产品

STR系统

产品	规格	目录号
PowerPlex® 16 HS System	100 人份	DC2101
	400 人份	DC2100
PowerPlex® 18D System	200 人份	DC1802
	800 人份	DC1808

不得用于医学诊断

附加组份

产品	规格	目录号
PowerPlex 5C Matrix Standard	5份	DG4850
SwabSolution™ Kit	100人份	DC8271
WEN ILS500	200µl	DG5001
Water, Amplification Grade	6250µl (5*1250µl)	DW0991

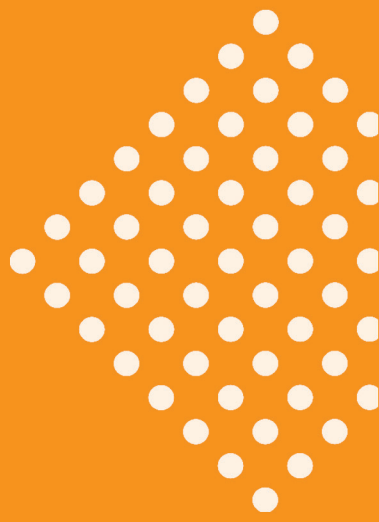
不得用于医学诊断

样品准备及定量系统

产品	规格	目录号
DNA IQ™ System	100 人份	DC6701
	400 人份	DC6700
Plexor® HY System*	800 人份	DC1000
	200 人份	DC1001

ART® 10 Ultramicro Pipet Tip

产品	体积	规格(个/每包)	目录号
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0.5-10µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0.5-10µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1,000µl	800	DY1131



普洛麦格（北京）生物技术有限公司
北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心B座907-909
电话：010-58256268 传真：010-58256160
网址：www.promega.com



Promega

www.promega.com