

# AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup>

PCR 扩增试剂盒

用户指南

© Copyright 2008, 2010, 2011 Applied Biosystems. All rights reserved.

**For Research, Forensic, or Paternity Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

**Notice to Purchaser: Limited License**

Use of the AmpF~~STR~~<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit is covered by US patent claims and patent claims outside the US. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in forensic and paternity testing, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Not for re-sale.

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), ABI PRISM, AMPF~~STR~~, GeneAmp, GeneMapper, GeneScan, Identifiler, LIZ, PET, Profiler Plus, Quantifiler, SGM Plus, and VIC are registered trademarks and FAM, GeneScan, Hi-Di, MicroAmp, NED, POP-4, and Sinofiler are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpliTag, AmpliTag Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

Windows NT is a registered trademark of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

文件号 4384242 修订版 D  
20110 04 25

# 目录

## 前言

如何使用本指南 .....	v
安全性 .....	vi
如何获取更多信息 .....	xi
如何获取支持 .....	xii

## 第 1 章

### 概述

产品概述 .....	1-2
流程图概述 .....	1-6
仪器和软件概述 .....	1-7
材料和设备 .....	1-9

## 第 2 章

### PCR 扩增

PCR 工作区 .....	2-2
必需的用户提供材料和试剂 .....	2-3
定量 DNA .....	2-4
准备反应 .....	2-6
实施 PCR .....	2-8
用血斑 FTA 卡扩增 .....	2-9

## 第 3 章

### 实施电泳

等位基因分型标准参照的要求 .....	3-2
为实施电泳而设置 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器 .....	3-3
准备 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器电泳样本 .....	3-4
为实施电泳而设置 310 仪器 .....	3-6
准备 310 仪器的电泳样本 .....	3-7

---

第 4 章	分析数据	
	GeneMapper® ID 软件概述	4-2
	设置 GeneMapper® ID 软件分析 AmpF $\mathcal{L}$ STR® Sinofiler™ 试剂盒数据	4-3
	用 GeneMapper® ID 软件分析和编辑样本文件	4-17

第 5 章	实验和结果	
	概述	5-2
	准确度、精确度和可重现性	5-3
	电泳图上的额外峰	5-17
	位点特征描述	5-26
	物种特异性	5-28
	灵敏度	5-30
	稳定性	5-32
	混合物研究	5-35
	群体数据	5-40
	突变率	5-55
	一致性概率	5-56
	亲子排除概率	5-57

附录 A	故障排除	
	故障排除	A-2

## 参考文献

## 索引

# 前言

## 如何使用本指南

- 本指南的目的** 本 *Applied Biosystems AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒用户指南* 提供与 AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒有关的 Applied Biosystems 的仪器、化学试剂和软件信息。
- 单抽章节** 本指南的编写使用户可以将第 2、3 和 4 章单抽出来使用，这些单抽章节有自己的标题页和背页，标注着章节号和标题。
- 文字体例** 本指南采用以下体例：
- **粗体** 文字表示用户操作动作。例如：  
键入 **0**，然后对剩下的每个字段按一下 **Enter** 键。
  - *斜体* 文字表示新的或重要的内容，也用于强调。例如：  
在开始分析之前，请 *始终* 准备好新的荧光色相。
  - 向右箭头符号 (▶) 用于分开您从下拉菜单或快捷菜单中依次选择的多个命令。例如：  
依次选择 **File (文件) ▶ Open (打开) ▶ Spot Set (点设置)**。  
右击样本行，然后选择 **View Filter (查看过滤器) ▶ View All Runs (查看所有运行)**。
- 用户警示文字** 在 Applied Biosystems 用户文档中，有两种用户警示文字。每种警示文字表示需遵守要求或采取行动的特定级别，如下所述：
- 注意：** — 提供相关的或帮助性信息，但这些信息对产品的使用并不是必不可少的。
- 切记！** — 提供正确操作仪器、精确使用化学试剂盒或安全使用某化学品所必须遵守的信息。

用户警示文字示例如下：

注意：控制台也具有 Calibrate（校准）功能。

切记！要验证您的客户机与数据库之间的连接，您需要一个有效用户 ID 和密码。


## 安全性


### 安全警示文字


用户文档中 Applied Biosystems 包括四种安全警示文字，显示在提醒您需要注意相关危险的位置。每种警示文字 — **切记**、**注意**、**警告**、**危险** — 表示需遵守要求或采取行动的特定级别，如下所述：

#### 定义

**切记！** — 表示正确操作仪器、精确使用化学试剂盒或安全使用某化学品所必需的信息。

 **注意** — 表示潜在的紧急情况如果不加以避免则可能导致轻微或中度伤害。它也用于警示不安全的操作行为。

 **警告** — 表示存在潜在的紧急情况，如果不加以避免，则可能导致死亡或严重伤害。

 **危险** — 表示存在紧迫的紧急情况，如果不加以避免，则可能导致死亡或严重伤害。此信号词只仅限于用于极端危险的情况。

### 化学品危险警告

 **警告** — **化学品危险**。用于 Applied Biosystems 仪器和实验方案使用的某些化学品具有潜在危险性，可造成受伤、生病或死亡。

## 化学品安全指南 欲最大限度地降低化学品的危险性您需要

- 在贮存、拿放或使用任何化学品或危险材料之前阅读并理解由化学品制造商提供的 **Material Safety Data Sheets (MSDS) 化学品安全信息表**。（请参阅第 **vii 页** “**关于化学品安全信息表 (MSDS)**”。）
- 尽量减少与化学品的接触。在拿放化学品时，应佩戴适当的人身防护用品（例如，安全防护眼镜、手套或防护服）。欲了解额外的安全指南，请参阅化学品安全信息表 (MSDS)。
- 尽量减少化学品的吸入。切勿敞放化学品容器。只能在通风良好的环境中使用化学品（例如，通风橱）。欲了解额外的安全指南，请参阅化学品安全信息表 (MSDS)。
- 定期检查化学品有无泄漏或溅溢。如果发现化学品泄漏或溅溢，请按照制造商在化学品安全信息表 (MSDS) 中建议的清洁方法进行清洁。
- 遵守所有当地、省 / 州或国家有关化学品贮存、拿放和处理的法律及规章要求。

### 关于化学品安全信息表 (MSDS)

化学品制造商在向新客户运送具有危险性的化学品时，都会向客户提供当前最新的化学品安全信息表 (MSDS)。当 MSDS 被更新后，制造商也会在第一次向客户发货时提供危险化学品的 MSDS。MSDS 提供有关化学品贮存、拿放、运输和处理所必需的安全信息。

每当您收到危险化学品包装内提供的新 MSDS 时，请一定以此 MSDS 替换您文件档案中的相应 MSDS。

### 获取 MSDS (材料安全数据表)

您可每天 24 小时免费索取由 Applied Biosystems 提供的任何化学品的 MSDS。要获取 MSDS：

1. 登陆 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) 网站，点击 **Support (支持)**，然后点击 **MSDS Search (MSDS 搜索)**。
2. 在 **Keyword Search (关键词搜索)** 字段中输入化学品名称、产品名称、MSDS 部件号或所需 MSDS 上所列的其它相关信息，然后点击 **Search (搜索)**。
3. 找到您所需的 MSDS 后，点击链接或用鼠标右键点击 MSDS 标题，然后选择以下任何一项：
  - **Open (打开)** — 查看 MSDS
  - **Print Target (打印目标)** — 打印 MSDS

- **Save Target As**（目标另存为）— 下载 PDF 格式的 MSDS

注意：欲获得不是由 Applied Biosystems 销售的化学品的 MSDS，请与相关的化学品制造商联系。

## 化学品废料危险



**注意 危险废料。**在拿放及处理废料时，请参阅化学品安全信息表 (MSDS) 及当地有关规章。



**警告 化学品废料危险。**由 Applied Biosystems 仪器产生的废料具有潜在的危險性，并可能导致受伤、生病或死亡。



**警告 化学品存放危险。**切勿使用玻璃容器收集或贮存废料，以防玻璃破裂或破碎。试剂和废料瓶可能会破碎和泄漏。每只废料瓶都应安全地放置在低密度聚乙烯安全容器内，并封紧封盖；而且手柄应锁定在直立位置上。在拿放试剂和废料瓶时，应佩戴适当的保护性眼镜、防护服和手套。



## 化学品废料 安全指南

欲最大限度地降低化学品废料的危险性您需要

- 在您贮存、拿放或处理化学品废料之前请阅读并理解由化学品制造商在废料容器中提供的化学品安全信息表 **MSDS**。
- 提供存放废料的主容器和辅助容器。（主容器用于贮存直接产生的废料。辅助容器用于贮存从主容器中溅溢或泄漏的废料。两个容器都必须与废料材料相兼容，而且必须符合国家、省 / 州及当地有关废料贮存的规章要求。）
- 尽量减少与化学品的接触。在拿放化学品时，应佩戴适当的人身防护品（例如，安全防护眼镜、手套或防护服）。欲了解额外的安全指南，请参阅化学品安全信息表（**MSDS**）。
- 尽量减少化学品的吸入。切勿敞放化学品容器。只能在通风良好的环境中使用化学品（例如，通风橱）。欲了解额外的安全指南，请参阅化学品安全信息表（**MSDS**）。
- 在通风橱中拿放化学品废料。
- 将废料容器倒空后，使用附带的封盖将容器密封好。
- 应按照良好的实验室操作规范和当地、省 / 州或国家环保和健康法规要求处理废料托盘和废料瓶中的废料。

## 处理废料

如果在操作仪器时产生了具有潜在危险性的废料，则您必须：

- 用所在实验室中使用的特定应用程序、试剂和底物，确定废料的性质（必要时进行分析）。
- 确保实验室中所有工作人员的健康和安全。
- 确保按照当地、省 / 州和 / 或国家的有关法规贮存、转移、运输和处理仪器废料。

**切记！** 放射性或生物危险性材料可能需要采取特别的方法拿放，而且可能有处理限制。

## 生物危险品安全



**警告**

**生物危险。**诸如人和其它动物的组织、体液、传染原和血液等生物标本均具有传播传染疾病的潜在危险性。应遵守当地、省 / 州和 / 或国家的所有适用法规。穿戴适当的防护设备，具体包括但不限于：保护眼镜、面罩、衣服 / 实验室防护服和手套。所有操作必须在设施装配完备的场所内，在使用适当的人身防护品（如物理防护设备）的情况下进行。在使用具有潜在传染性的物质之前，必须按照适用法规和公司 / 机构的要求培训操作人员。认真阅读并遵守下列适用指南和 / 或规章的要求：

- U.S. Department of Health and Human Services（美国卫生与人类服务部）指南登载于 *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*（微生物和生物医学实验室生物安全规章）（存档编号 017-040-00547-4；网址 [bmbi.od.nih.gov](http://bmbi.od.nih.gov)）。
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens（职业安全和健康标准，血源性病原体）（29 CFR § 1910.1030，网址 [www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_01/29cfr1910a\\_01.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html)）。
- 所在公司 / 机构有关使用 / 拿放具有潜在传染性物质的生物安全计划方案。

有关生物危险指南的额外信息见：

[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

## 如何获取更多信息

**相关文件** 欲获得任何以下文件请登陆 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) 然后点击链接 **Support**（支持）▶ **Products & Services Literature**（产品及服务文献）。

文件	文件编号
Applied Biosystems 3130/3100xl 基因分析仪数据采集软件 3.0 版用户通报	4363787
Applied Biosystems 3130/3100xl 基因分析仪使用入门指南	4352715
Applied Biosystems 3130/3100xl 基因分析仪保养、故障排除和参考指南	4352716
Applied Biosystems 3130/3100xl 基因分析仪快捷参考卡	4362825
Applied Biosystems 3130/3100xl 基因分析仪 AB 导航软件管理员指南	4359472
ABI PRISM® 3100/3100-Avant 数据采集软件 2.0 版用户指南	4347102
ABI PRISM® 3100/3100-Avant 基因分析仪数据采集软件 2.0 版用户通报	4350218
ABI PRISM® 3100 基因分析仪用户手册数据采集软件 1.1 版	4315834
ABI PRISM® 3100-Avant 基因分析仪用户指南数据采集软件 1.0 版	4333549
ABI PRISM® 3100/3100-Avant 基因分析仪处理 AmpF $\Phi$ STR® PCR 扩增试剂盒 PCR 产物方案用户通报	4332345
ABI PRISM® 310 基因分析仪用户指南 (Windows NT)	4317588
GeneMapper® ID 软件 3.2 版安装操作程序和新功能® 用户通报	4352543
GeneMapper® ID 软件 3.1 和 3.2 版人类个体鉴定分析教程	4335523
GeneMapper® ID 软件 3.1 版人类个体鉴定分析用户指南	4338775
Quantifiler® 试剂盒 Quantifiler® 人类 DNA 定量试剂盒及 Quantifiler® Y 男性 DNA 定量试剂盒用户手册	4344790
GeneMapper® ID 软件 3.2.1 版补丁用户通报	4382255
AmpF $\Phi$ STR® Identifiler® PCR 扩增试剂盒用户手册	4323291

注意：有关其它文件请参阅第 xii 页“如何获取支持”。

## 将您的意见发送给我们

Applied Biosystems 欢迎提出您的宝贵意见和建议，以便我们能不断提高用户文件质量。您可用电子邮件将意见或建议发送至：

[techpubs@appliedbiosystems.com](mailto:techpubs@appliedbiosystems.com)

切记！上述电子邮件地址仅限用于提交与文件有关的意见和建议。要订购文件、下载 PDF 文件或寻求技术帮助，请登陆网站 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)，然后点击 **Support（支持）** 链接。（参阅下文“**如何获取支持**”。）

## 如何获取支持

有关所有地区产品服务和技术支持的最新信息，请登陆网站 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)，然后点击 **Support（支持）** 链接。

在 **Support（支持）** 页面上，您可以：

- 获得全球各地的电话和传真号码 Applied Biosystems 以便联络技术支持和销售部门。
- 搜索常见问题与解答 (FAQ)
- 直接向技术支持部门提问
- 订购 Applied Biosystems 用户文件、MSDS、分析证书及其它相关文件
- 下载 PDF 文件
- 获取客户培训信息
- 下载软件更新和补丁程序

本章包括：

产品概述 .....	1-2
流程图概述 .....	1-6
仪器和软件概述 .....	1-7
材料和设备 .....	1-9

表 1-3 用户提供的材料‡ (续)

物品	来源
离心管, 50-mL Falcon	主要实验室供应商
微离心管开盖器, 可高压灭菌	主要实验室供应商
去离子水, PCR 级	主要实验室供应商
Tris-HCL, pH 8.0	主要实验室供应商
0.5-M EDTA	主要实验室供应商
震荡器	主要实验室供应商

‡ 欲了解并非由 Applied Biosystems 经销的化产品的化学品安全数据信息表 (MSDS), 请与化学品制造商联系。在使用任何化学品之前, 请参阅由设备制造商提供的化学品安全数据信息表 (MSDS), 并遵守所有相关注意事项。

## 产品概述

**目的** AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒（Sinofiler 试剂盒）是一种短串联重复（STR）多重分析，它在单个 PCR 反应中扩增 15 个常染色体 STR 位点（D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、D5S818、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、vWA、D12S391、D18S51、D6S1043、FGA）和性别标记位点 Amelogenin。

**产品描述** Sinofiler 试剂盒含有扩增人类基因组 DNA 所必需的所有试剂。按设计，这些试剂适用于以下 Applied Biosystems 仪器：

- Applied Biosystems 3130/3130*xl* 基因分析仪
- ABI PRISM<sup>®</sup> 3100/3100-*Avant* 基因分析仪
- ABI PRISM<sup>®</sup> 310 基因分析仪
- GeneAmp<sup>®</sup> PCR 系统 9600
- 96 孔银座 GeneAmp<sup>®</sup> PCR 系统 9700
- 镀金银座 GeneAmp<sup>®</sup> PCR 系统 9700

**关于引物** AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒使用的引物序列与以前的 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> 试剂盒基本相同，不同点是 D6S1043 和 D12S391。适用于位点 D8S1179、vWA 和 D16S539 的兼并引物被加到 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 引物组中，以便应对引物结合点的突变。加入兼并引物后，可以对含有突变的等位基因样本实施扩增，而 AmpF $\ell$ STR Sinofiler PCR 扩增试剂盒的总体性能并无改变。

非核苷酸链接用于以下位点的引物合成 CSF1PO、D5S818、D13S317、D16S539、D2S1338、D12S391、D18S51、Amelogenin 和 D6S1043。对于这些引物来说，寡核苷酸合成过程中，非核苷酸链接被置于引物和荧光标记之间（Butler 2005, Grossman *et al.*, 1994, 和 Baron *et al.*, 1996）。非核苷酸链接可增加位点间的距离，以确保等位基因的定位可以再现。通过将五种荧光标记系统与非核苷酸链接结合使用，可以在自动 DNA 片段分析过程中同时扩增和有效地将 15 个 STR 位点与 Amelogenin 分离。

用试剂盒扩增的位点 表 1-1 显示的是扩增的位点、它们的染色体位置和相应的荧光标记物。AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照被用于对分析的样本实施基因分型。等位基因分型标准参照中的等位基因和对照 DNA 9947A 的基因型也列于表中。

表 1-1 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒位点和等位基因

位点名称	染色体位置	Sinofiler 等位基因分型标准参照中含有的等位基因	荧光标记	对照 DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM <sup>™</sup>	13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC <sup>®</sup>	14, 15
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED <sup>™</sup>	14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		18, 20
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19



表 1-1 AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒位点和等位基因 (续)

位点名称	染色体位置	Sinofiler 等位基因分型标准参照中含有的等位基因	荧光标记	对照 DNA 9947A
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET <sup>®</sup>	X
D6S1043	6q16.1	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 21.3, 22, 23, 24, 25		12, 18
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24

等位基因分型标准  
参照

图 1-1 显示的是 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒等位基因分型标准参照。请参阅第 3-2 页“等位基因分型标准参照的要求”，了解确保基因分型准确的信息。

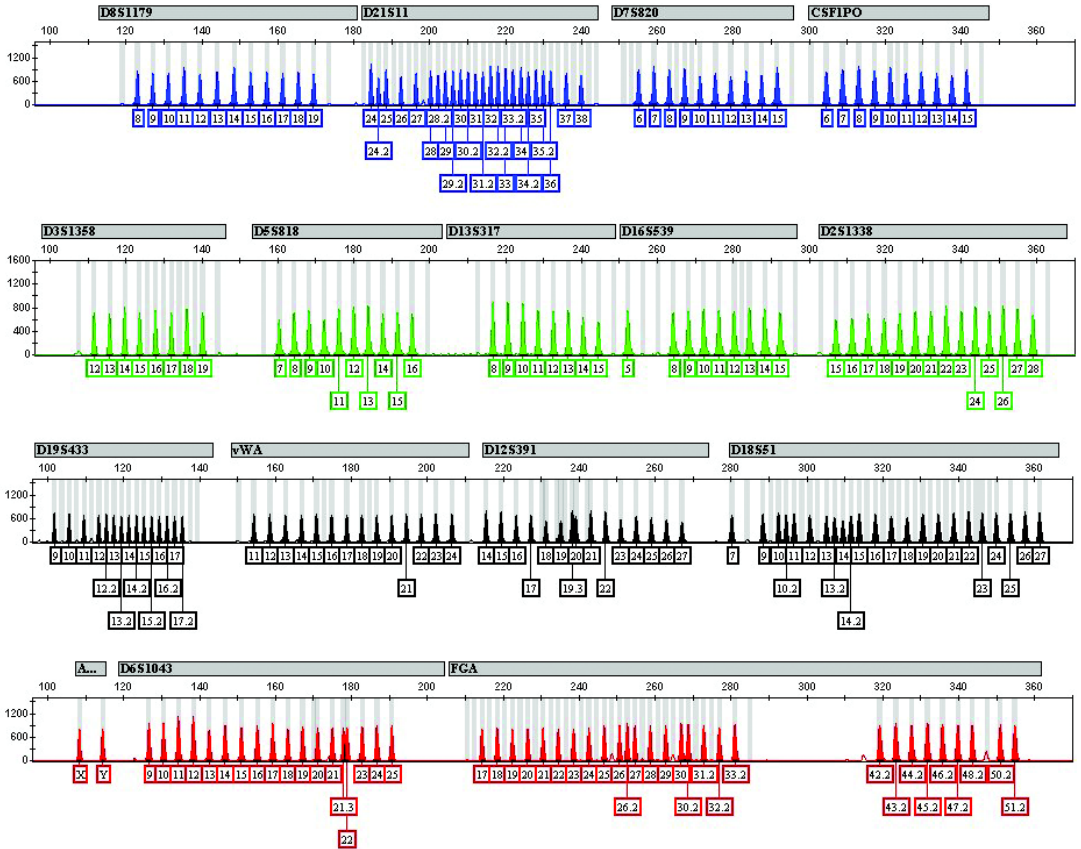
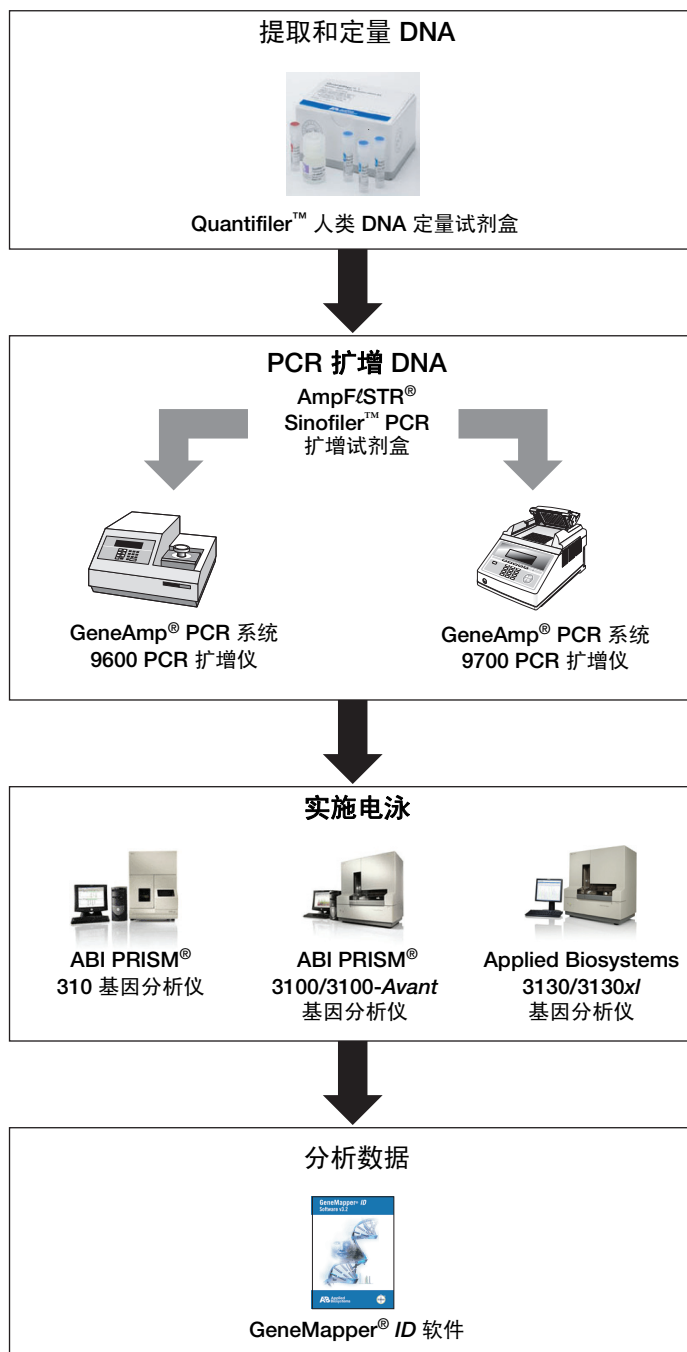


图 1-1 GeneMapper<sup>®</sup> ID 软件 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照图

## 流程图概述



## 仪器和软件概述

本章节内容提供电泳特定仪器所需的 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒数据采集和分析软件的信息。

### 数据采集和分析软件

数据采集软件向仪器上运行的固件下达指令，并实时显示仪器状态和原始数据。随着仪器以其检测系统测量样本荧光，数据采集软件收集和储存数据。数据采集软件将每个样本的信息储存为一个样本文件（.fsa），后者可用分析软件予以分析。

### 仪器和软件的兼容性

仪器	操作系统	数据采集软件	分析软件
3130/3130x $\ddagger$	Windows XP	3.0	GeneMapper <sup>®</sup> ID 3.2.1 及以后版本
3100/3100-Avant	Windows NT <sup>®</sup>	1.1 (3100) 1.0 (3100-Avant)	GeneMapper ID 3.2.1 及以后版本
	Windows 2000	2.0	GeneMapper ID 3.2.1 及以后版本
310	Windows XP	3.1	GeneMapper ID 3.2.1 及以后版本
	Windows NT 和 Windows 2000	3.0	GeneMapper ID 3.2.1 及以后版本

$\ddagger$  Applied Biosystems 可以采用这些配置实施 Sinofiler 试剂盒验证研究。

### 关于多组分分析

使用 Applied Biosystems 荧光多颜色标记技术，可以分析多个位点，其中包括那些等位基因片段大小范围相互重叠的位点。可以用不同颜色的荧光标记标定位点特异性引物，从而区分相互重叠位点上的等位基因。

多组分分析是一个将五种不同颜色的荧光标记分离成清晰光谱成分的过程。用于标定 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler PCR 扩增试剂盒的四种荧光标记是 6-FAM<sup>™</sup>、VIC<sup>®</sup>、NED<sup>™</sup> 和 PET<sup>®</sup> 荧光标记。第五种荧光标记是 LIZ<sup>®</sup>，用于标定 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准。

## 多组分分析 工作原理

每种荧光标记会以不同波长发射出最强荧光。在 Applied Biosystems 和 ABI PRISM<sup>®</sup> 仪器上采集数据时，衍射光栅根据荧光信号波长将其分离，并按一个预定间隔模式投射到一个电荷耦合器件 (CCD) 上。6-FAM 荧光标记发射的波长最短，被显示为蓝色，接下来是 VIC 荧光标记（绿色）、NED 荧光标记（黄色）、PET 荧光标记（红色）和 LIZ 荧光标记（橙色）。

尽管每种荧光标记以不同波长发射最强荧光，各种荧光标记之间在发射光谱上仍有重叠（图 1-2）。多组分分析的目标是校正色谱重叠部分。

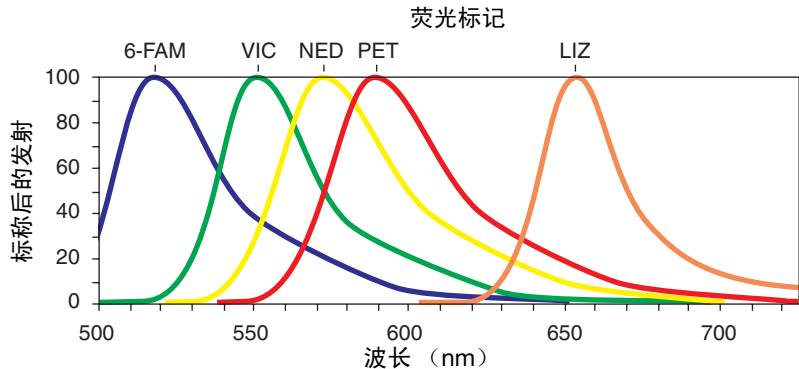


图 1-2 用于 AmpF/STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的五种荧光标记的发射光谱

## 材料和设备

**试剂盒内容物** AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒含有的以下试剂和许可，足以实施 200 次 25- $\mu$ L 扩增。

组分	描述	容积
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> PCR 反应混合物	两管含有 MgCl <sub>2</sub> 、三磷酸脱氧核苷酸，血清白蛋白和 0.05% 叠氮钠的缓冲液。	1.1 mL/管
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 引物组	两管荧光标记引物和未标记引物。	0.55 mL/管
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> 对照 DNA 9947A	一管的 0.10 ng/ $\mu$ L 人类女性细胞系 DNA 于 0.05% 叠氮钠和缓冲液内（参阅第 1-3 页和 1-10 了解特性）	0.3 mL
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 等位基因分型标准参照	一管的 AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 等位基因分型标准参照，内含扩增的等位基因。见表 1-1 在第 1-3 页和 1-10，了解等位基因分型标准参照内含有的等位基因清单。	50 $\mu$ L
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA 多聚酶	两管酶，酶的活性为 5 U/ $\mu$ L	50 $\mu$ L/管

### 试剂盒的存放和稳定性

下列表格罗列了试剂盒组分的存放温度。

连接在引物上的荧光标记是光敏材料。不使用时，要避免光照 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 引物组。扩增的 DNA、AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照和 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准也应该避免光照。

组分	存放温度
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> PCR 反应混合物	收到时存放在 -20 °C，初次使用后保存在 2 到 8 °C
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> 对照 DNA 9947A	
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 等位基因分型标准参照	
AmpliTaq Gold DNA 多聚酶	-15 到 -25 °C
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 引物组	

**样本标准** 对于 Sinofiler 试剂盒 PCR 扩增、PCR 产物大小测定和基因分型所需要的标准试剂是：

- **对照 DNA 9947A** — 一个用于评价以 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 等位基因分型标准参照实施扩增和 STR 基因分型效率的阳性对照物。
- **GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准** — 用于获得片段大小结果。它含有 16 单链片段：35、50、75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490 和 500 核苷酸。此标准片段已被用做内标标准片段，在 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler PCR 产物上产生精确的片段大小结果。GeneScan 500 LIZ 标准片段（PN 4322682）单独订购。
- **AmpF $\mathcal{L}$ STR® Sinofiler™ 等位基因分型标准参照** — 由 Applied Biosystems 研制，用于准确鉴定以 Sinofiler 试剂盒扩增的等位基因。AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 等位基因分型标准参照内含 15 个常染色体位点上的常见等位基因。参阅第 1-3 页“用试剂盒扩增的位点”，了解 Sinofiler 试剂盒包含的所有等位基因。

**未包括在内的设备和材料** 表 1-2 和 1-3 罗列了必需和另选的未包括在 Sinofiler 试剂盒内的设备和材料。除非另有说明，其中的许多物品都可以从主要实验室用品供应商处（MLS）购买。

表 1-2 设备

设备	来源
Applied Biosystems 3130/3100xI 基因分析仪	联系所在地的 Applied Biosystems 销售代表
ABI PRISM® 3100/3100-Avant 基因分析仪	
ABI PRISM® 310 基因分析仪	
GeneAmp® PCR 系统 9700，带 96 孔银座	N8050001
GeneAmp® PCR 系统 9700，带镀金银座	4314878
96 孔样本银座	N8050251
镀金 96 孔样本银座	4314443
台式离心机，带 96 孔反应板适配器（另选）	主要实验室供应商 (MLS)

表 1-3 用户提供的材料†

物品	来源
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒	4382306
3130/3100xI 分析仪材料	
96 孔反应板橡胶垫	4315933
液槽橡胶垫	4315932
3130xI/3100 基因分析仪毛细管, 36-cm	4315931
3130/3100-Avant 基因分析仪毛细管, 36-cm	4333464
POP-4 <sup>™</sup> 胶, 用于 3130/3130xI 基因分析仪	4352755
3100/3100-Avant 基因分析仪扩增反应板试剂盒, 96 孔	4316471
GeneScan <sup>™</sup> 500 LIZ <sup>®</sup> 片段标准	4322682
电泳缓冲液, 10X	402824
DS-33 荧光色相标准试剂盒 (G5 荧光标记组)	4345833
MicroAmp <sup>™</sup> 光学 96 孔反应板	N8010560
Hi-Di <sup>™</sup> 甲酰胺	4311320
欲了解用于 3130/3130xI 仪器的完整部件和附件清单, 请参阅 <i>Applied Biosystems 3130/3130xI 基因分析仪保养、故障排除和参考指南 - 附录 A</i> (PN 4352716)。	



表 1-3 用户提供的材料‡ (续)

物品	来源
3100/3100-Avant 基因分析仪	
96 孔反应板橡胶垫	4315933
液槽橡胶垫	4315932
3130xl/3100 基因分析仪毛细管, 36-cm	4315931
3130/3100-Avant 基因分析仪毛细管, 36-cm	4333464
POP-4™ 胶, 用于 3100/3100-Avant 基因分析仪	4316355
3100/3100-Avant 基因分析仪扩增反应板试剂盒, 96 孔	4316471
GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	4322682
电泳缓冲液, 10×	402824
DS-33 荧光色相标准试剂盒 (G5 荧光标记组)	4345833
MicroAmp™ 光学 96 孔反应板	N8010560
250-μL 玻璃注射器 (毛细管填胶注射器)	4304470
5.0-mL 玻璃注射器 (储存胶注射器)	628-3731
欲了解用于 3100/3100-Avant 仪器的完整部件和附件清单, 请参阅 <i>ABI PRISM® 3100 基因分析仪和 3100-Avant 基因分析仪用户参考指南 - 附录 B</i> (PN 4335393)。	
310 分析仪材料	
310 基因分析仪毛细管, 47-cm	402839
0.5-mL 样本托盘	5572
96 孔托盘适配器 (用于 9700 PCR 仪托盘)	4305051
GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	4322682
电泳缓冲液, 10×	402824
基因分析仪橡胶垫固定夹, 用于 96 管样本托盘	402866
基因分析样本管 (0.5-mL)	401957

表 1-3 用户提供的材料<sup>‡</sup> (续)

物品	来源
用于 0.5-mL 样本管的橡胶垫	401956
DS-33 荧光色相标准组 [6FAM™、VIC®、NED™、PET® 和 LIZ® 荧光标记] 用于 ABI PRISM® 310/377 系统	4318159
MicroAmp™ 8 管反应条, 0.2-mL	N8010580
MicroAmp™ 96 孔底座 (用于放 0.2-mL 反应管)	N8010531
MicroAmp™ 96 孔全板盖	N8010550
MicroAmp™ 96 孔托盘 / 固定装置	403081
POP-4™ 胶, 用于 310 基因分析仪	402838
欲了解用于 310 仪器的完整部件和附件清单, 请参阅 <i>ABI PRISM® 310 基因分析仪用户指南 - 附录 B</i> (PN 4317588)。	
PCR 扩增	
MicroAmp™ 96 孔托盘	N8010541
MicroAmp® 带盖反应管, 0.2-mL	N8010540
MicroAmp™ 8 管反应条, 0.2-mL	N8010580
MicroAmp™ 8 盖条	N8010535
MicroAmp™ 96 孔托盘 / 固定装置	403081
MicroAmp™ 96 孔底座	N8010531
MicroAmp™ 光学 96 孔反应板	N8010560
用户提供的其它材料	
Hi-Di™ 甲酰胺, 25-mL	4311320
防气雾移液器吸头	主要实验室供应商
微量离心管	主要实验室供应商
移液枪	主要实验室供应商
胶带, 标签	主要实验室供应商

# 第 2 章

## PCR 扩增



本章包括：

PCR 工作区 .....	2-2
必需的用户提供材料和试剂 .....	2-3
定量 DNA .....	2-4
准备反应 .....	2-6
实施 PCR .....	2-8
用血斑 FTA 卡扩增 .....	2-9

## PCR 工作区

### PCR 设置 工作区

切记！ 以下物品一定不得离开 PCR 设置工作区。

- 计算器
- 手套，一次性的
- 记号笔，永久性
- 微型离心机
- 微型离心管， 1.5-mL 或 2.0-mL 或其它适当的干净试管（用于配制反应母液）
- 微型离心管架
- 移液器吸头， 无菌， 一次性带疏水性滤塞
- 移液器
- 微离心管开盖器， 可高压灭菌
- 震荡器

### 扩增的 DNA 工作区

切记！ 以下 GeneAmp® PCR 系统一定不得离开扩增的 DNA 工作区内。

- 银制 96 孔 GeneAmp® PCR 系统 9700
- 镀金银座 GeneAmp® PCR 系统 9700
- GeneAmp® PCR 系统 9600


## 必需的用户提供材料和试剂

**试剂盒内容物和存放** 每个 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒含有足够实施 200 次反应的材料，反应体积为 25- $\mu$ L。参阅第 1-9 页“[试剂盒内容物](#)”，了解 Sinofiler 试剂盒详细内容。

切记！连接在引物上的荧光标记物是光敏材料。不使用时，要避免光照引物。扩增的 DNA、AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照和 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准也应该避免光照。尽可能减少冷冻—融化次数。

**用户提供的试剂** 除 Sinofiler 试剂盒试剂外，还建议使用低 TE 缓冲液（10 mM Tris，0.1 mM EDTA，pH 8.0）。可以按下表中的说明配制缓冲液或向 Teknova（目录编号 T0223）订购。

欲配制低 TE 缓冲液

1.	<p>将以下试剂混合：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL 1 M Tris-HCl，pH 8.0</li> <li>• 0.2 mL 0.5 M EDTA，pH 8.0</li> <li>• 990 mL 玻璃蒸馏或去离子水</li> </ul> <p> <b>警告</b> 化学品危险。EDTA。暴露接触会刺激眼睛。请认真阅读 MSDS 并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p> <p>注意：根据具体需要调整容积。</p>
2.	分装和高压灭菌处理溶液。
3.	室温下存放。

## 定量 DNA

**定量的重要性** 通过定量某样本中的 DNA 可以确定是否有足够的 DNA 实施适当扩增。可以确定获得 0.50 至 1.25 ng DNA 所需的最小容积。但是 DNA 最大允许添加量为 10  $\mu$ L。

如果在 PCR 反应中加入过多 DNA，增加的 PCR 产物量会导致：

- 超过以仪器检测所需线性动态范围的荧光强度（“超高”数据）。  
超高数据可造成如下问题：
  - 超高峰的定量（峰高和面积）不准确。例如，超高的等位基因峰可造成相应的滑移峰相对强度增高，使计算的滑移峰百分比增加。
  - 超高数据的多组分分析也会不准确，可造成光谱分离不佳（“色谱交叉杂峰”）。
- +A 腺苷酸添加不完整

当添加到 PCR 的等位基因拷贝总数特别低时，会遗漏等位基因，只能获得部分图谱。

**DNA 定量方法** Applied Biosystems 提供数种试剂盒，以便准确定量样本中的 DNA。参阅第 2-5 页表 2-1 中的参考资料，以便详细了解这些试剂盒。



表 2-1 DNA 定量方法


产品	描述	参考资料
Quantifiler® Y 人类男性 DNA 定量试剂盒 (PN 4343906)	<b>属性:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 两种 Quantifiler® 试剂盒均有较高的人类 DNA 特异性。Quantifiler® Y 试剂盒对人类男性 DNA 具有较高的特异性。</li> <li>• 试剂盒检测单链和降解的 DNA。</li> </ul>	Quantifiler® 人类 DNA 定量试剂盒 用户手册 (PN 4344790)
Quantifiler® 人类 DNA 定量试剂盒 (PN 4343895)	<b>工作原理:</b> DNA 定量分析结合了两种 5' 端核酸外切酶反应: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 靶点特异性 (人类 DNA 或人类男性 DNA) 分析, 由用于扩增人类或人类男性 DNA 的两种引物和一种以 FAM™ 荧光标记物标记用来检测扩增序列的 TaqMan® MGB 探针组成。</li> <li>• 内部 PCR 对照 (IPC) 分析, 由一个 IPC 模板 DNA (一个自然界里没有的合成序列)、两个用于扩增 IPC 模板 DNA 的引物和一个以 VIC® 荧光标记物标记用于检测扩增的 IPC 模板 DNA 的 TaqMan MGB 探针组成。</li> </ul>	

## 准备反应

**反应母液** 将 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> PCR 反应混合物、AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA 多聚酶和 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 引物组试剂混合在一起配制反应母液。

切记！连接在引物上的荧光标记是光敏材料。不使用时，要避免光照 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler 引物组。还要避免 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler 等位基因分型标准参照、GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准和扩增的经荧光标记的 PCR 产物遭受光照。

### 欲配制反应母液

1.	确定包括对照在内的样本总数。								
2.	<p>切记！ 震荡以下试剂 5 秒钟</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• AmpF<math>\mathcal{L}</math>STR<sup>®</sup>PCR 反应混合物</li> <li>• AmpliTaq Gold DNA 多聚酶</li> <li>• AmpF<math>\mathcal{L}</math>STR<sup>®</sup> Sinofiler 引物组</li> </ul> <p> <b>警告</b> 化学品危险。AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA 聚合酶可导致眼睛和皮肤刺激症状。如果吞咽或吸入后会导致不适。请认真阅读 MSDS 并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p>								
3.	用微型离心机短暂离心以便去除盖上的液体。								
4.	<p>选择一个干净未用过的微离心管装反应母液。</p> <table border="1" data-bbox="485 1107 1202 1281"> <thead> <tr> <th>如果你正在准备 ...</th> <th>请用一个 ...</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>≤84 个样本和对照</td> <td>1.5-mL 微型离心管</td> </tr> <tr> <td>85-110 个样本和对照</td> <td>2.0-mL 微型离心管</td> </tr> <tr> <td>&gt;110 个样本和对照</td> <td>适宜试管</td> </tr> </tbody> </table>	如果你正在准备 ...	请用一个 ...	≤84 个样本和对照	1.5-mL 微型离心管	85-110 个样本和对照	2.0-mL 微型离心管	>110 个样本和对照	适宜试管
如果你正在准备 ...	请用一个 ...								
≤84 个样本和对照	1.5-mL 微型离心管								
85-110 个样本和对照	2.0-mL 微型离心管								
>110 个样本和对照	适宜试管								
5.	<p>按如下所示计算所需要的组分量</p> <p>注意： 根据以下公式得出的容积会稍微高一些以弥补转移中丢失的容积。</p> <p>样本数 × 10.5 μL AmpF<math>\mathcal{L}</math>STR<sup>®</sup> PCR 反应混合物</p> <p>样本数 × 0.5 μL AmpliTaq Gold DNA 多聚酶</p> <p>样本数 × 5.5 μL AmpF<math>\mathcal{L}</math>STR<sup>®</sup> Sinofiler 引物组</p>								

## 欲配制反应母液 (续)


6.	取适量在步骤 5 以得的各种组分加入微量离心管中。
7.	以中等速度震荡反应母液 3 秒钟然后短暂离心试管或反应板后打开离心管。
8.	取 15 $\mu\text{L}$ 反应母液加入各反应管或反应板孔内。

准备 Sinofiler  
试剂盒反应

1.	准备 DNA 样本								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>DNA 样本</th> <th>欲准备 ...</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>阴性对照</td> <td>加 10 <math>\mu\text{L}</math> 低 TE 缓冲液于反应管或反应板孔内。</td> </tr> <tr> <td>待测样本</td> <td>以低 TE 缓冲液稀释待测 DNA 样本, 使 10 <math>\mu\text{L}</math> 最终容积中的 DNA 总含量为 0.50–1.25 ng。将待测样本加到反应管或反应板孔内。</td> </tr> <tr> <td>阳性对照</td> <td>加 10 <math>\mu\text{L}</math> 对照 DNA 9947A (0.1 ng/<math>\mu\text{L}</math>) 于反应管或反应板孔内。</td> </tr> </tbody> </table>	DNA 样本	欲准备 ...	阴性对照	加 10 $\mu\text{L}$ 低 TE 缓冲液于反应管或反应板孔内。	待测样本	以低 TE 缓冲液稀释待测 DNA 样本, 使 10 $\mu\text{L}$ 最终容积中的 DNA 总含量为 0.50–1.25 ng。将待测样本加到反应管或反应板孔内。	阳性对照	加 10 $\mu\text{L}$ 对照 DNA 9947A (0.1 ng/ $\mu\text{L}$ ) 于反应管或反应板孔内。
DNA 样本	欲准备 ...								
阴性对照	加 10 $\mu\text{L}$ 低 TE 缓冲液于反应管或反应板孔内。								
待测样本	以低 TE 缓冲液稀释待测 DNA 样本, 使 10 $\mu\text{L}$ 最终容积中的 DNA 总含量为 0.50–1.25 ng。将待测样本加到反应管或反应板孔内。								
阳性对照	加 10 $\mu\text{L}$ 对照 DNA 9947A (0.1 ng/ $\mu\text{L}$ ) 于反应管或反应板孔内。								
	注意: 最终反应体积应为 25 $\mu\text{L}$ 。								
2.	在带有反应板架的台式离心机上以 3000 rpm 速度离心反应板大约 20 秒钟, 以便去除气泡。								
3.	在 GeneAmp® PCR 系统 9600 或银制 96 孔 GeneAmp® PCR 系统 9700 或镀金银座 GeneAmp® PCR 系统 9700 上扩增 DNA。								

# 实施 PCR

## 欲运行 PCR

1.	设计热循环条件。					
	切记！ 如果使用镀金银座或银制 96 孔 GeneAmp PCR 系统 9700 选择 <b>9600 模拟模式</b> 。					
	最初保温步骤	循环 28 个循环			最终延伸	最终温度保持
		变性	退火	延伸		
	保持	循环			保持	保持
	95 °C 11 分钟	94 °C 1 分钟	59 °C 1 分钟	72 °C 1 分钟	60 °C 60 分钟	4 °C ∞
2.	将反应板加载到 PCR 仪上关闭热护盖。					
	 <b>警告 人身伤害危险。</b> 在仪器运行过程中，热护盖的温度可高达 108 °C，样本加热块的温度可高达 100 °C。不得用手触摸热护盖和样本加热块。					
3.	启动反应。					
4.	存放扩增的 DNA。					
	如果你存放 DNA 的时间是 ...			存放在 ...		
	<2 个星期			2 至 8 °C		
	>2 个星期			-15 至 -25 °C		
	切记！ 防止光照扩增产物。					

## 用血斑 FTA 卡扩增

FTA™ 处理过的 DNA 采集卡对于生物样本的采集、存放和处理十分有用。血斑卡上的小圆片可以直接放入扩增管内提纯并扩增而无需转移证据。Applied Biosystems 研究证实，1.2-mm 血斑圆片含的 DNA 大约为 5-20 ng。相应地，对如此之高的 DNA 数量，其适当循环数为 25 个，建议每个实验室根据各自的验证研究确定循环数。

从图 2-1 中的例子可以看出，一个 1.2-mm 的血斑 FTA 圆片被用 FTA 提纯试剂提纯三次，再以 1× TE 缓冲液清洗两次。在室温下隔夜干燥后，圆片被直接放入 MicroAmp® 管中扩增 25 个循环。

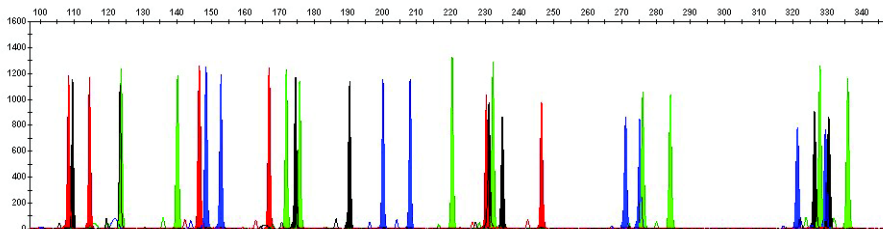


图 2-1 AmpF $\ell$ STR® Sinofiler™ PCR 扩增试剂盒结果，来自 1.2-mm FTA 血斑圆片（25-循环扩增），以 ABI PRISM® 3130xl 基因分析仪分析。









# 第 3 章

## 电泳



# 实施电泳

---

本章包括

等位基因分型标准参照的要求 .....	3-2
为实施电泳而设置 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器 .....	3-3
准备 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器电泳样本 .....	3-4
为实施电泳而设置 310 仪器 .....	3-6
准备 310 仪器的电泳样本 .....	3-7

## 等位基因分型标准参照的要求

欲准确地对样本进行基因分型必须在检测未知样本时还要一个等位基因分型标准参照样本。对于在以下仪器上检测的样本：

- ABI PRISM<sup>®</sup> 310 基因分析仪 — 每进样十次至少要电泳一次等位基因分型标准参照。
- ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 或 Applied Biosystems 3130 系列仪器 — 每组 16 个样本至少要电泳一次等位基因分型标准参照。
  - Applied Biosystems 3130*xl* 或 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 — 每进样一次，电泳一次等位基因分型标准参照，每次进样含有 16 个样本。  
(15 个样本 + 1 个等位基因分型标准参照)
  - Applied Biosystems 3130 或 ABI PRISM<sup>®</sup> *Avant* — 每进样四次，电泳一次等位基因分型标准参照，每次进样含有 4 个样本

切记！实验室内温度的差异可导致片段移动速度的改变从而导致片段大小不一。Applied Biosystems 建议以上等位基因分型标准参照进样频率，此频率可消除移动速度的正常差异。然而，在内部验证研究中，需验证所需要的等位基因分型标准参照进样频率，以保证能在贵实验室环境下准确地对所有样本进行基因分型。

要在与样本相同的条件下电泳等位基因分型标准参照，这一点对基因分型很重要因为

- 由于胶质和电泳条件的不同，同一样本在不同的仪器上可能会获得不同的片段大小数值。
- 单一和多个毛细管之间的轻微操作和试剂差异会导致片段大小出现较大差异差异会大于在同一次电泳中进样到同一毛细管的样本间差异。

# 为实施电泳而设置 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器

**试剂和部件** 第 1-11 页表 1-3 罗列了所需要但未随 AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒一起供应的材料。

切记！ 连接在引物上的荧光标记是光敏材料。不使用时要避免光照引物组。扩增的 DNA、AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照和 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准也应该避免光照。尽量减少冷冻 - 融化过程。

**电泳设置软件和参考文献** 此表罗列了用于分析 Sinofiler 试剂盒产品的数据采集软件和电泳模式。欲了解操作程序的详细内容请参阅表中罗列的文件。


操作系统	数据采集软件	电泳模式	参考文献
Windows XP	3.0 (3130/3130xl 分析仪 <sup>‡</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIDFragmentAnalysis36_POP4_1</li> <li>• 荧光标记组 G5</li> </ul>	<i>Applied Biosystems 3130/3130xl 基因分析仪使用数据采集软件 3.0 版处理方案 AmpF<math>\Delta</math>STR<sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒 PCR 产物用户通报 (PN 4363787)</i>
Windows 2000	2.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIDFragmentAnalysis36_POP4_1</li> <li>• 荧光标记组 G5</li> </ul>	<i>ABI PRISM<sup>®</sup> 3100/3100-Avant 基因分析仪使用数据采集软件 2.0 版处理方案 AmpF<math>\Delta</math>STR<sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒 PCR 产物用户通报 (PN 4350218)</i>
Windows NT <sup>®</sup>	1.1 (3100 分析仪)	电泳模式 GeneScan36vb_DyeSetG5Module 分析模式 GS500Analysis.gsp	<i>ABI PRISM<sup>®</sup> 3100/3100-Avant 基因分析仪处理方案 AmpF<math>\Delta</math>STR<sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒 PCR 产物用户通报 (PN 4332345)</i>
	1.0 (3100-Avant 分析仪)	电泳模式 GeneScan36Avb_DyeSetG5Module 分析模式 GS500Analysis.gsp	

<sup>‡</sup> Applied Biosystems 用此配置为 Sinofiler 试剂盒实施了验证研究。


## 准备 3100/3100-*Avant* 或 3130/3130*xl* 仪器电泳样本

**准备样本** 在加样前即刻准备 3100/3100-*Avant* 或 3130/3130*xl* 电泳样本。

欲为电泳准备样本

1.	<p>根据下表计算准备样本所需要的 Hi-Di™ 甲酰胺和 GeneScan™ 500 LIZ® 容积。</p> <table border="1" data-bbox="471 479 1204 661"> <thead> <tr> <th data-bbox="471 479 921 548">试剂</th> <th data-bbox="921 479 1204 548">每次反应的容积 (μL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="471 548 921 604">GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准</td> <td data-bbox="921 548 1204 604">0.3</td> </tr> <tr> <td data-bbox="471 604 921 661">Hi-Di™ 甲酰胺</td> <td data-bbox="921 604 1204 661">8.7</td> </tr> </tbody> </table> <p>注意：在您的计算中包括一些额外样本以便为试剂转移期间发生的损失提供多余容积。</p> <p>切记！表格中的片段标准容积是推荐量。请根据您的结果 / 实验确定适宜的片段标准容积。</p> <p> <b>警告</b> 化学品危险。Hi-Di 甲酰胺。暴露接触会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。它可能影响胎儿发育造成先天性缺陷。请认真阅读化学品安全信息表并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p>	试剂	每次反应的容积 (μL)	GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	0.3	Hi-Di™ 甲酰胺	8.7
试剂	每次反应的容积 (μL)						
GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	0.3						
Hi-Di™ 甲酰胺	8.7						
2.	吸取所需要容积的成份加入尺寸适宜的聚丙烯管中。						
3.	振荡离心管然后短暂离心。						
4.	<p>在 MicroAmp™ 光学 96-孔反应板的每个孔加</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 μL 甲酰胺片段标准混合物</li> <li>• 1 μL PCR 产物或等位基因分型标准参照</li> </ul> <p>注意：在空白孔内加 10 μL Hi-Di™ 甲酰胺。</p>						
5.	用适宜的橡胶垫密封好反应板然后将反应板短暂离心确保每个反应孔内的内容物混合均匀并集中在底部。						

## 欲为电泳准备样本 (续)

6.	在 PCR 仪中加热反应板 3 分钟 95 °C。  <b>警告 人身伤害危险。</b> 在仪器运行过程中热护盖的温度可高达 108 °C，样本加热块的温度可高达 100 °C。不得用手触摸热护盖和样本加热块。
7.	立即将反应板放在冰上 3 分钟。
8.	在自动进样器上准备反应板。
9.	开始电泳分析。

## 为实施电泳而设置 310 仪器

**试剂和部件** 第 1-11 页表 1-3 罗列了所需要但未随 AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒一起供应的材料。

切记！连接在引物上的荧光标记是光敏材料。不使用时要避免光照引物组。扩增的 DNA、AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照和 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准也应该避免光照。尽可能减少冷冻 - 融化过程。

**电泳设置软件和参考文献** 以下表格罗列了用于分析 Sinofiler 试剂盒产品的数据采集软件和电泳模式。欲了解分析程序的详细内容，请参阅表中罗列的文件。

操作系统	数据采集软件	电泳模式	参考文献
Windows XP	3.1 <sup>‡</sup>	GS STR POP4 (1 mL) G5 v2.md5	ABI PRISM <sup>®</sup> 310 基因分析仪用户手册 Windows (PN 4317588) ABI PRISM <sup>®</sup> 310 处理方案 AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒产品 Microsoft Windows NT 操作系统 用户通报 (PN 4341742)
Windows NT <sup>®</sup> 和 Windows 2000	3.0	GS STR POP4 (1 mL) G5 v2.md5	ABI PRISM <sup>®</sup> 310 基因分析仪用户手册 Windows (PN 4317588) ABI PRISM <sup>®</sup> 310 处理方案 AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒产品 Microsoft Windows NT 操作系统 用户通报 (PN 4341742)


<sup>‡</sup> Applied Biosystems 用此配置为 Sinofiler 试剂盒实施了验证研究。




## 准备 310 仪器的电泳样本

**准备样本** 加载前即刻准备 310 仪器的电泳样本。

欲为电泳准备样本

1.	<p>根据下表计算准备样本所需要的 Hi-Di™ 甲酰胺和 GeneScan™ 500 LIZ® 容积。</p> <table border="1" data-bbox="512 470 1239 649"> <thead> <tr> <th data-bbox="512 470 973 534">试剂</th> <th data-bbox="973 470 1239 534">每次反应的容积 (μL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="512 534 973 591">GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准</td> <td data-bbox="973 534 1239 591">0.5</td> </tr> <tr> <td data-bbox="512 591 973 649">Hi-Di™ 甲酰胺</td> <td data-bbox="973 591 1239 649">24.5</td> </tr> </tbody> </table> <p>注意：在您的计算中包括一些额外样本以便为试剂转移期间发生的损失提供多余容积。</p> <p>切记！表格中的片段标准容积是推荐量。请根据您的结果 / 实验确定适宜的片段标准容积。</p> <p> <b>警告 化学品危险。Hi-Di 甲酰胺。</b> 暴露接触会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。它可能影响胎儿发育造成先天性缺陷。请认真阅读化学品安全信息表并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p>	试剂	每次反应的容积 (μL)	GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	0.5	Hi-Di™ 甲酰胺	24.5
试剂	每次反应的容积 (μL)						
GeneScan™ 500 LIZ® 片段标准	0.5						
Hi-Di™ 甲酰胺	24.5						
2.	吸取所需要容积的成份加入尺寸适宜的聚丙烯管中。						
3.	振荡离心管然后短暂离心。						
4.	<p>在每个 0.2-mL 或 0.5-mL 样本管内加</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 μL 甲酰胺片段标准混合物</li> <li>• 1.5 μL PCR 产物或等位基因分型标准参照</li> </ul>						
5.	用适宜的橡胶垫密封好样本管，然后短暂离心，确保每个样本管内的内容物混合均匀并集中在底部						

欲为电泳准备样本 (续)

6.	在 PCR 中加热样本管 3 分钟 95 °C。  <b>警告</b> 人身伤害危险。在仪器运行过程中受热护盖的温度可高达 108 °C 样本加热块的温度可高达 100 °C。不得用手触摸热护盖和样本加热块。
7.	立即将样本管放在冰上 3 分钟。
8.	将样本盘放在自动进样器上。
9.	开始电泳。





# 第 4 章

## 分析数据



# 分析数据

---

本章包括：

GeneMapper® ID 软件概述 .....	4-2
设置 GeneMapper® ID 软件分析 AmpF $\mathcal{L}$ STR® Sinofiler™ 试剂盒数据 .....	4-3
用 GeneMapper® ID 软件分析和编辑样本文件 .....	4-17

## GeneMapper® ID 软件概述

GeneMapper® ID 软件是一种自动基因分型软件，用于法医、亲子鉴定和数据库分析以及其它基因分型用途。

电泳后，数据采集软件将每个样本的信息储存为一个 *fsa* 文件。使用 GeneMapper ID 3.2.1 和 3.3 版软件，你可以分析和解读 *fsa* 文件中的数据。

**仪器** 参阅第 1-7 页 “[仪器和软件概述](#)”，查看兼容仪器的清单。

**使用之前** 用试剂盒以 GeneMapper ID 软件 3.2.1 和 3.3 版实施个体识别 (HID) 分析时，AmpF $\mathcal{L}$ STR® 请注意以下情况：

- HID 分析需要每个电泳文件夹内至少有一个等位基因分型标准参照样本。你的实验室可在一个分析中使用多个标准参照样本，但前提是该实验室实施适当的验证。  
使用多个标准参照样本时，GeneMapper ID 软件以同一电泳文件夹内使用相同标准片段组的所有标准参照之平均数值计算等位基因 *bin* 偏移范围。
- 每个电泳文件夹内的等位基因分型标准参照样本被认为是来自同一次电泳。  
当软件将多个电泳文件夹导入到一个项目时，只有在其各自电泳文件夹内的标准参照才能被用于计算等位基因 *bin* 偏移范围和随后的基因分型。
- 在一个项目的样本类型栏中，必须将等位基因分型标准参照样本标注为“等位基因分型标准参照”。不这样设置标准参照样本会导致分析失败。
- 等位基因 *bin* 定义保存在 AmpF $\mathcal{L}$ STR\_Sinofiler Panel Manager（标准片段组管理器）的标准片段组内。
- 必须采用用于样本的相同分析方法和参数数值分析含有等位基因分型标准参照的泳道或进样，以保证能够正确识别等位基因。



- 不在 AmpF $\mathcal{L}$ STR® 等位基因分型标准参照中的等位基因确实存在。非标准等位基因可能含有全部和 / 或部分重复单位。非标准等位基因是出现在任何已知等位基因分型标准参照或虚拟 bin  $\pm 0.5$ -nt bin 范围以外的等位基因。

**注意：** 如果某样本的等位基因峰被称为非标准等位基因，则需要根据实验室方案对样本的结果实施验证。

## 设置 GeneMapper® ID 软件分析 AmpF $\mathcal{L}$ STR® Sinofiler™ 试剂盒数据

**工作流程** 在第一次用 GeneMapper ID 软件 3.2.1 或 3.3 版分析样本之前，你需要：

- 按第 4-4 页 “导入标准片段组和 Bin（只限 3.2.1 版）” 中的说明将标准片段组和 bin 导入 Panel Manager（标准片段组管理器）。（此部分内容不适用 GeneMapper ID 软件 3.3 版，后者在安装过程中自动安装标准片段组和 bin 组）。
- 按第 4-9 页 “导入一个 HID 分析方法 3.2.1 和 3.3 版” 导入分析方法。
- 按第 4-16 页 “导入一个 HID 片段标准 3.2.1 和 3.3 版” 导入片段。

- 定义分析表格的自定义视图（3.2.1 和 3.3 版）。

参阅 *GeneMapper® ID 软件 3.1 和 3.2 版个体识别分析教程的第 1 章* (PN 4335523)，了解详细内容。

- 定义图谱的自定义视图（3.2.1 和 3.3 版）

参阅 *GeneMapper® ID 软件 3.1 和 3.2 版个体识别分析教程的第 1 章* (PN 4335523)，了解详细内容。

- 如果需要，用随 GeneMapper ID 软件附带的 Mac-to-Win AppleScript® 软件将在 Macintosh® 平台上生成的 GeneScan 软件样本文件转换为 fsa 格式。具体转换过程见 *GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南* (PN 4338775)。

**有关详情** 快速设置说明，参阅 *GeneMapper® ID 软件 3.3 版使用入门指南* (PN 4385329)。

欲详细了解 *GeneMapper ID* 功能，参阅 *GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南* (PN 4338775) 和 *GeneMapper® 软件 3.1 和 3.2 版个体识别分析教程* (PN 4335523)。也请参阅 *GeneMapper 安装操作程序和新功能® ID 软件 3.2 版用户通报* (PN 4352543)。

### 导入标准片段组和 Bin (只限 3.2.1 版)

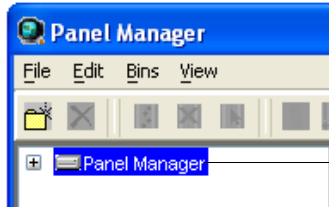
欲从 Applied Biosystems 网站上将 Sinofiler 试剂盒标准片段组和 Bin 组导入 *GeneMapper ID* 软件 3.2.1 版数据库：

欲导入标准片段组和 Bin 组

1.	<p>下载并打开含有标准片段组和 Bin 组的文件：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a. 打开一个因特网浏览器，然后从 <a href="http://www.appliedbiosystems.com/support/download/GeneMapper/GMID_Sinofiler_files.zip">www.appliedbiosystems.com/support/download/GeneMapper/GMID_Sinofiler_files.zip</a> 下载 GMID_Sinofiler_files.zip 文件。</li> <li>b. 解压文件。</li> </ol>
2.	<p>启动 <i>GeneMapper ID</i> 软件，然后以正确的用户名和密码登录。</p> <p><b>切记！</b> 如果需要了解登录说明，请参阅 <i>GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南</i> 的第 2-7 页 (PN 4338775)。</p>
3.	<p>选择 <b>Tools (工具) ▶ Panel Manager (标准片段组管理器)</b>。</p>

欲导入标准片段组和 Bin 组 ( 续 )

4. 找到并打开含有标准片段组和 Bin 的文件夹
  - a. 选择浏览窗口中的 **Panel Manager** (标准片段组管理器)。

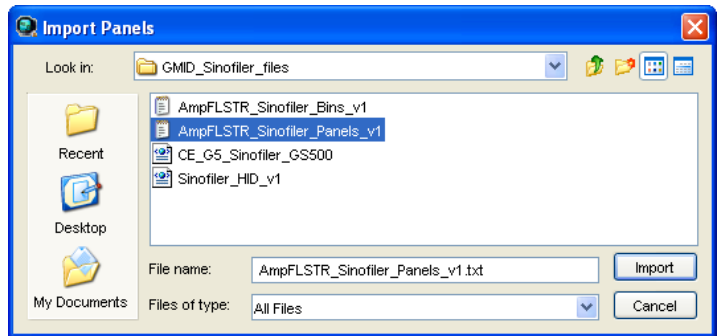


予以突出显示。

- b. 选择 **File** (文件) ▶ **Import Panels** (导入标准片段组) 以便打开 Import Panels (导入标准片段组) 对话框。
  - c. 找到并打开在第一步解压的 GMID\_Sinofiler\_files 文件夹。

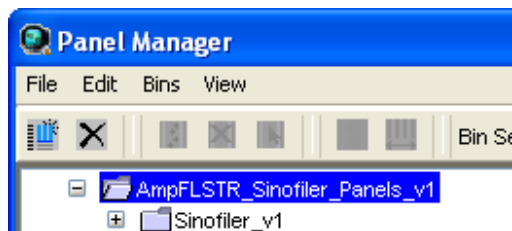
5. 选择 **AmpFLSTR\_Sinofiler\_Panels\_v1** 然后点击 **Import** (导入)。

**注意：** 导入文件会在 Panel Manager (标准片段组管理器) 的浏览窗口内创建一个新文件夹 - **AmpFLSTR\_Sinofiler\_Panels\_v1**。此文件夹内含有各种标准片段组及相关位点。



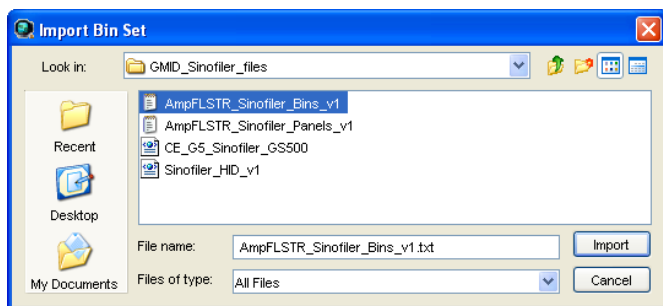
## 欲导入标准片段组和 Bin 组 (续)

6. 导入 AmpFLSTR\_Sinofiler\_Bins\_v1:
  - a. 在浏览窗口内选择 **AmpFLSTR\_Sinofiler\_Panels\_v1** 。



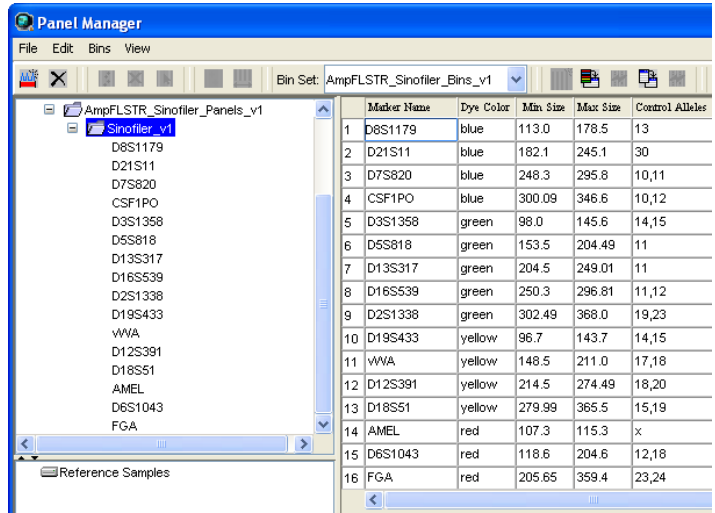
- b. 选择 **File (文件) ▶ Import Bin Set (导入 Bin 组)** 以便打开 **Import Bin Set (导入 Bin 组)** 对话框。
  - c. 找到并打开解压的 **GMID\_Sinofiler\_files** 文件夹。
  - d. 选择 **AmpFLSTR\_Sinofiler\_Bins\_v1**，然后点击 **Import (导入)**。

**注意：** 导入此文件会将 Bin 组与 AmpFLSTR\_Sinofiler\_Panels\_v1 文件夹中的标准片段组相关联。



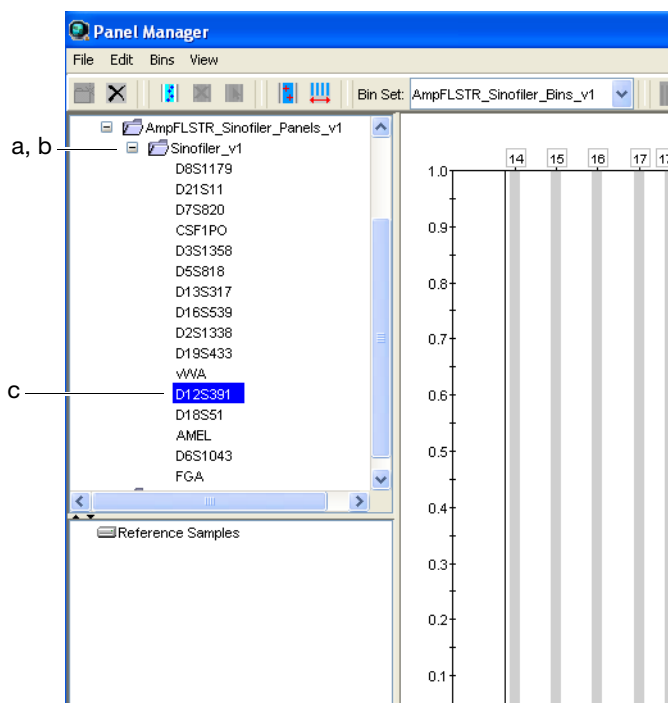
## 欲导入标准片段组和 Bin 组 (续)

7. 在浏览窗口内查看导入的标准片段组：
  - a. 双击 **AmpFLSTR\_Sinofiler\_Panels\_v1** 文件夹以便查看 Sinofiler\_v1 文件夹。
  - b. 双击 **Sinofiler\_v1** 文件夹，以便在右侧窗口显示标准片段组信息及其下的位点。



## 欲导入标准片段组和 Bin 组 (续)

8. 在浏览窗口内查看位点并显示 Bin 视图：
  - a. 选择 **Sinofiler\_v1** 文件夹，以便在右侧窗口内显示其位点清单。
  - b. 双击 **Sinofiler\_v1** 文件夹，以便显示其下的位点清单。
  - c. 选择 **D12S391**，以便在右侧窗口内显示位点的 Bin 视图。



9. 点击 **Apply** (应用) 然后 **OK** 以便将 Sinofiler 标准片段组和 Bin 组添加到 GeneMapper ID 数据库中。

**切记！** 如果你未点击 **OK** 就关闭了 Panel Manager (标准片段组管理器)，则标准片段组和 Bin 无法导入到 GeneMapper ID 数据库中。

## 导入一个 HID 分析方法 3.2.1 和 3.3 版

用于 AmpF $\Phi$ STR® Sinofiler™ PCR 扩增试剂盒的分析方法采用 HID Advanced Mode Peak Detection Algorithm (HID 高级模式峰值检测算法)。通过这种分析方法，用户可以将 GeneScan® 软件 3.7 版中相同的分析参数用于 Windows 操作系统。

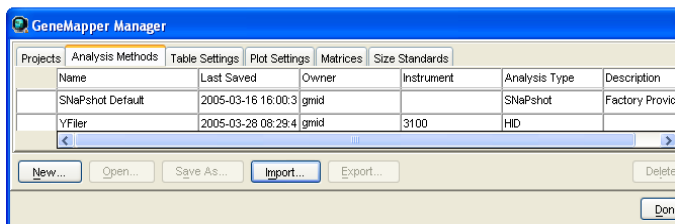
**注意：** 以下 HID 高级模式分析方法使用 AmpFLSTR\_Sinofiler\_Bins\_v1 文件，见第 4-11 页表 4-1。

采用以下操作程序，从 Applied Biosystem 网站下载的文件夹中将用于 Sinofiler 试剂盒的分析方法导入到 GeneMapper ID 软件数据库中。参阅第 4-4 页步骤 1，了解下载说明。

**注意：** 在 GMID ID 软件 3.3 版中，Sinofiler\_HID\_v1\_33 分析方法是默认的分析方法。遵循以上操作程序，可以手工方式导入 GeneMapper ID 软件 3.3 版随附方法以外的其他分析方法。

欲向 GeneMapper ID 软件导入 HID 高级模式分析方法

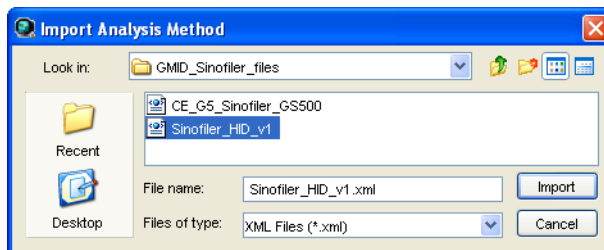
1. 选择 **Tools (工具) ▶ GeneMapper Manager (管理器)**，以便打开 GeneMapper Manager (管理器)。
2. 为 HID\_Advanced 导入分析方法
  - a. 选择 **Analysis Methods (分析方法)** 标签然后点击 **Import (导入)**。



- b. 找到并打开 **GMID\_Sinofiler\_files** 文件夹。

## 欲向 GeneMapper ID 软件导入 HID 高级模式分析方法 (续)

3. 选择 **Sinofiler\_HID\_v1** 然后点击 **Import** (导入) 以便将 **Sinofiler\_HID\_v1** 分析方法导入到 GeneMapper ID 数据库中。



4. 欲查看 **Sinofiler\_HID\_v1** 分析方法的设置
  - a. 选择 **Analysis Methods** (分析方法) 标签。
  - b. 在 **Name** (名称) 栏中选择 **Sinofiler\_HID\_v1** 然后点击 **Open** (打开)。

第 4-11 页表 4-1 显示 Analysis Method Editor - HID (分析方法编辑器 - HID) 每个标签的各种设置。



表 4-1 Sinofiler\_HID\_v1 高级模式分析方法设置

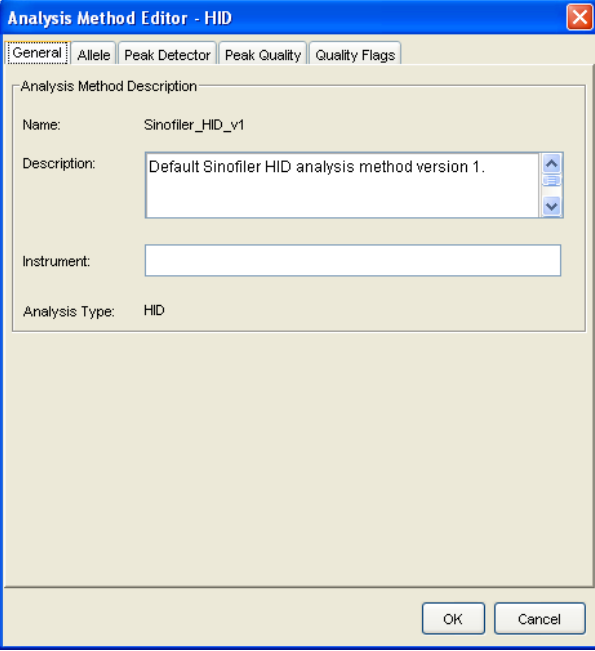
标签	设置
一般	<p>名称 Sinofiler_HID_v1</p>  <p>The screenshot shows a dialog box titled "Analysis Method Editor - HID". It has four tabs: "General", "Allele", "Peak Detector", and "Quality Flags". The "General" tab is active. Under "Analysis Method Description", the "Name" is "Sinofiler_HID_v1", the "Description" is "Default Sinofiler HID analysis method version 1.", the "Instrument" field is empty, and the "Analysis Type" is "HID". There are "OK" and "Cancel" buttons at the bottom right.</p>

表 4-1 Sinofiler\_HID\_v1 高级模式分析方法设置 (续)

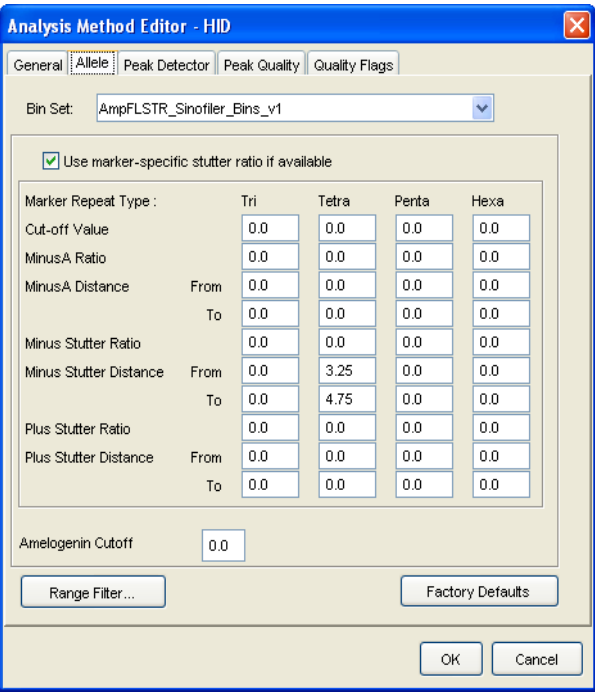
标签	设置																																																				
等位基因	 <p><b>Analysis Method Editor - HID</b></p> <p>General   <b>Allele</b>   Peak Detector   Peak Quality   Quality Flags</p> <p>Bin Set: AmpFLSTR_Sinofiler_Bins_v1</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Use marker-specific stutter ratio if available</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Marker Repeat Type :</th> <th>Tri</th> <th>Tetra</th> <th>Penta</th> <th>Hexa</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cut-off Value</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>MinusA Ratio</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">MinusA Distance</td> <td>From</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>To</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>Minus Stutter Ratio</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Minus Stutter Distance</td> <td>From</td> <td>0.0</td> <td>3.25</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>To</td> <td>0.0</td> <td>4.75</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>Plus Stutter Ratio</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Plus Stutter Distance</td> <td>From</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> <tr> <td>To</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> <td>0.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>Amelogenin Cutoff: 0.0</p> <p>Range Filter... Factory Defaults</p> <p>OK Cancel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 通过 GeneMapper® ID 软件 3.2.1 和 3.3 版你可以规定四类位点反复基序 tri（三）、tetra（四）、penta（五）和 hexa（六）。你可以在适当的栏中为每类重复输入参数数值。</li> <li>• 按默认设置，"Use marker-specific stutter ratio if available"（如果可用，请使用与位点有关的滑移峰比值）复选框已被选择。因此，软件会使用随 AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1 文件附带的滑移峰带比值过滤器。</li> </ul> <p>注意：欲了解等位基因过滤器的详细信息，请参阅 GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南第 3 章 (PN 4338775) 和 GeneMapper® ID 软件 3.2 版用户通报安装操作程序和新功能 (PN 4352543)。</p>	Marker Repeat Type :	Tri	Tetra	Penta	Hexa	Cut-off Value	0.0	0.0	0.0	0.0	MinusA Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0	MinusA Distance	From	0.0	0.0	0.0	To	0.0	0.0	0.0	Minus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0	Minus Stutter Distance	From	0.0	3.25	0.0	To	0.0	4.75	0.0	Plus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0	Plus Stutter Distance	From	0.0	0.0	0.0	To	0.0	0.0	0.0
Marker Repeat Type :	Tri	Tetra	Penta	Hexa																																																	
Cut-off Value	0.0	0.0	0.0	0.0																																																	
MinusA Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0																																																	
MinusA Distance	From	0.0	0.0	0.0																																																	
	To	0.0	0.0	0.0																																																	
Minus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0																																																	
Minus Stutter Distance	From	0.0	3.25	0.0																																																	
	To	0.0	4.75	0.0																																																	
Plus Stutter Ratio	0.0	0.0	0.0	0.0																																																	
Plus Stutter Distance	From	0.0	0.0	0.0																																																	
	To	0.0	0.0	0.0																																																	

表 4-1 Sinofiler\_HID\_v1 高级模式分析方法设置 (续)

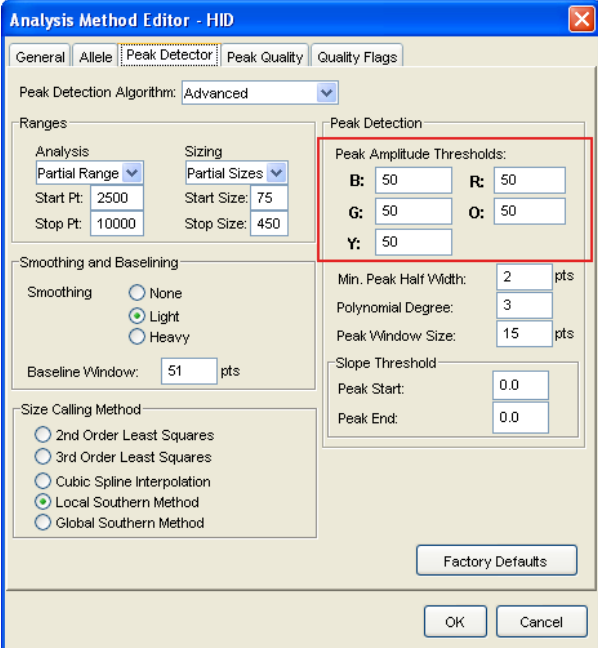
标签	设置
峰检测器	<p>切记！实验室需要实施适当的内部验证研究，以便确定峰高阈值（以下以红色突出显示），以便更好地解释 Sinofiler 数据。</p>  <p>软件使用峰检测参数来规定最低峰高，以限制检测到的峰数目。尽管 GeneMapper ID 软件显示电泳图中那些低于规定高度的峰，但软件并不标记或确定这些峰的基因类型。</p> <p>注意：分析范围由用户根据引物峰和片段标准峰的位置设置。</p> <p>注意：欲了解峰检测算法，请参阅 GeneMapper ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南 (PN 4338775) 附录 A 和 GeneMapper ID 软件 3.2 版本用户通报 安装操作程序和新功能 (PN 4352543)。</p>

表 4-1 Sinofiler\_HID\_v1 高级模式分析方法设置 (续)

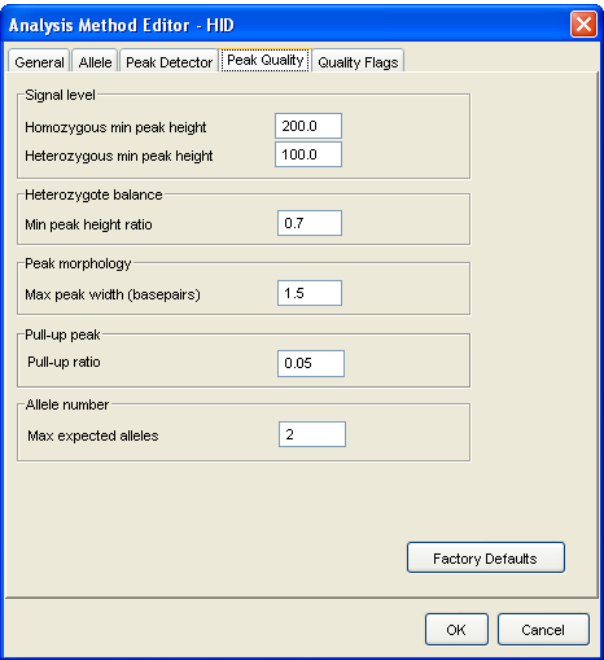
标签	设置
峰质	 <p>The screenshot shows the 'Analysis Method Editor - HID' window with the 'Peak Quality' tab selected. The settings are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Signal level<ul style="list-style-type: none"><li>Homozygous min peak height: 200.0</li><li>Heterozygous min peak height: 100.0</li></ul></li><li>Heterozygote balance<ul style="list-style-type: none"><li>Min peak height ratio: 0.7</li></ul></li><li>Peak morphology<ul style="list-style-type: none"><li>Max peak width (basepairs): 1.5</li></ul></li><li>Pull-up peak<ul style="list-style-type: none"><li>Pull-up ratio: 0.05</li></ul></li><li>Allele number<ul style="list-style-type: none"><li>Max expected alleles: 2</li></ul></li></ul> <p>Buttons: Factory Defaults, OK, Cancel</p>

表 4-1 Sinofiler\_HID\_v1 高级模式分析方法设置 (续)

标签	设置																									
质量旗标和 PQV 阈值	 <p><b>Analysis Method Editor - HID</b></p> <p>General   Allele   Peak Detector   Peak Quality   <b>Quality Flags</b></p> <p>Quality weights are between 0 and 1.</p> <p>Quality Flag Settings:</p> <table border="1"> <tr> <td>Spectral Pull-up</td> <td>0.8</td> <td>Control Concordance</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>Broad Peak</td> <td>0.8</td> <td>Low Peak Height</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>Out of Bin Allele</td> <td>0.8</td> <td>Off-scale</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>Overlap</td> <td>0.8</td> <td>Peak Height Ratio</td> <td>0.3</td> </tr> </table> <p>PQV Thresholds:</p> <table border="1"> <tr> <td></td> <td><b>Pass Range:</b></td> <td><b>Low Quality Range:</b></td> </tr> <tr> <td>Sizing Quality:</td> <td>From 0.75 to 1.0</td> <td>From 0.0 to 0.25</td> </tr> <tr> <td>Genotype Quality:</td> <td>From 0.75 to 1.0</td> <td>From 0.0 to 0.25</td> </tr> </table> <p>Factory Defaults</p> <p>OK Cancel</p>	Spectral Pull-up	0.8	Control Concordance	1.0	Broad Peak	0.8	Low Peak Height	0.3	Out of Bin Allele	0.8	Off-scale	0.8	Overlap	0.8	Peak Height Ratio	0.3		<b>Pass Range:</b>	<b>Low Quality Range:</b>	Sizing Quality:	From 0.75 to 1.0	From 0.0 to 0.25	Genotype Quality:	From 0.75 to 1.0	From 0.0 to 0.25
Spectral Pull-up	0.8	Control Concordance	1.0																							
Broad Peak	0.8	Low Peak Height	0.3																							
Out of Bin Allele	0.8	Off-scale	0.8																							
Overlap	0.8	Peak Height Ratio	0.3																							
	<b>Pass Range:</b>	<b>Low Quality Range:</b>																								
Sizing Quality:	From 0.75 to 1.0	From 0.0 to 0.25																								
Genotype Quality:	From 0.75 to 1.0	From 0.0 to 0.25																								

## 导入一个 HID 片段标准 3.2.1 和 3.3 版

用于 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的片段标准在其片段大小算法中使用下列 GS500 峰。75、100、139、150、160、200、300、350、400 和 450。

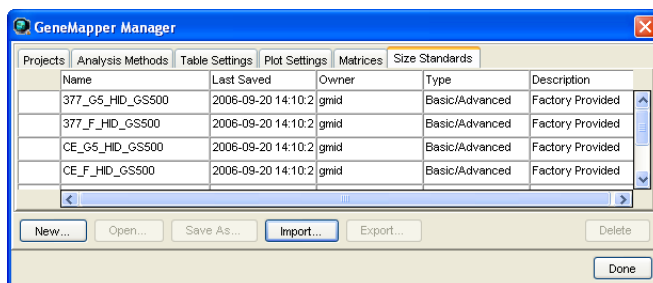
采用以下操作程序，从 Applied Biosystem 网站上下下载的文件夹中将用于 Sinofiler 试剂盒的片段标准导入到 *GeneMapper ID* 软件数据库中。参阅第 4-4 页步骤 1，了解下载说明。

**注意：** 在 GMID *ID* 3.3 版软件中，CE\_G5\_Sinofiler\_GS500 片段标准是默认片段标准。

### 导入一个 HID 片段标准

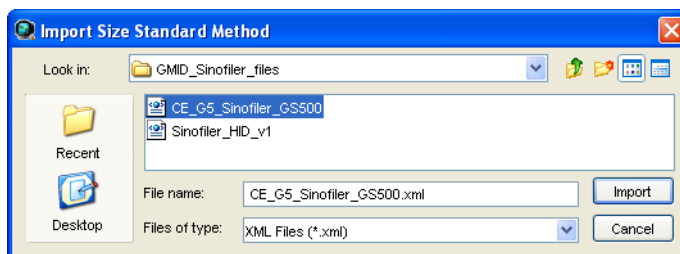
1. 选择 **Tools (工具) ▶ GeneMapper Manager (管理器)**，以便打开 GeneMapper Manager (管理器)。

2. 导入一个片段标准
  - a. 选择 **Size Standards (片段标准)** 标签然后点击 **Import (导入)**。



- b. 找到并打开 **GMID\_Sinofiler\_files** 文件夹。

3. 选择 **CE\_G5\_Sinofiler\_GS500** 然后点击 **Import (导入)** 以便将 Sinofiler\_HID\_v1 分析方法导入到 GeneMapper *ID* 数据库中。




# 用 GeneMapper® ID 软件分析和编辑样本文件

分析一个项目  
(3.2.1 和 3.3 版)

欲分析一个项目

1.	在项目窗口内，选择 <b>File</b> （文件） ▶ <b>Add Samples</b> （添加样本）到 <b>Project</b> （项目），然后找到含有样本文件的磁盘或目录。																
2.	<p>将分析设置应用到项目中的样本上。</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">参数</th> <th style="text-align: center;">高级分析方法</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>样本类型</td> <td>选择样本类型</td> </tr> <tr> <td>分析方法（3.2.1 版）</td> <td><b>Sinofiler_HID_v1</b></td> </tr> <tr> <td>分析方法（3.3 版）</td> <td><b>Sinofiler_HID_v1_33</b></td> </tr> <tr> <td>标准片段组（3.2.1 版）</td> <td><b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b></td> </tr> <tr> <td>标准片段组（3.3 版）</td> <td><b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b></td> </tr> <tr> <td>片段标准‡</td> <td><b>CE_G5_Sinofiler_GS500§,#</b></td> </tr> <tr> <td>荧光色相</td> <td>选择一个荧光色相，只限于用于 310 仪器。</td> </tr> </tbody> </table> <p>‡ 欲了解有关判定器的工作原理请参阅 <i>ABI PRISM® GeneScan® 分析软件 Windows NT® 操作系统概述分析参数和判定器用户通报</i> (PN 4335617)。</p> <p>§ 以下片段为 CE_G5_Sinofiler_GS500 片段标准而定义随 AmpFLSTR® 试剂盒附带。75、100、139、150、160、200、300、350、400 和 450。有关片段标准的详细内容，请参阅 <i>GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南</i> (PN 4338775) 附录 D。</p> <p># 250-nt 和 340-nt 峰均不包括在片段标准定义之中。这些峰可用做某次检测中的精确性指标。</p>	参数	高级分析方法	样本类型	选择样本类型	分析方法（3.2.1 版）	<b>Sinofiler_HID_v1</b>	分析方法（3.3 版）	<b>Sinofiler_HID_v1_33</b>	标准片段组（3.2.1 版）	<b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b>	标准片段组（3.3 版）	<b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b>	片段标准‡	<b>CE_G5_Sinofiler_GS500§,#</b>	荧光色相	选择一个荧光色相，只限于用于 310 仪器。
参数	高级分析方法																
样本类型	选择样本类型																
分析方法（3.2.1 版）	<b>Sinofiler_HID_v1</b>																
分析方法（3.3 版）	<b>Sinofiler_HID_v1_33</b>																
标准片段组（3.2.1 版）	<b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b>																
标准片段组（3.3 版）	<b>AmpFLSTR_Sinofiler_Panels_v1</b>																
片段标准‡	<b>CE_G5_Sinofiler_GS500§,#</b>																
荧光色相	选择一个荧光色相，只限于用于 310 仪器。																

## 欲分析一个项目 (续)

3. 点击  **Analyze** (分析) 然后为项目命名。在保存项目对话框内然后点击 **OK** 开始分析。
  - 状态条显示分析进程：
    - 随着分析的不断完成，状态条以百分比形式向右侧延伸
    - 文字消息显示在左侧
  - 表格以绿色显示目前正在分析的样本行（如果该样本分析失败则以红色显示）。
  - 分析完成后基因类型标签便可使用。

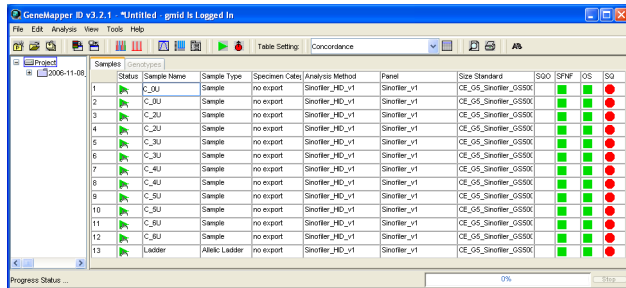


图 4-1 分析前的项目窗口

欲了解这些任务的详细内容请参阅 *GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体分析用户指南* (PN 4338775)。

### 检查和编辑项目 (3.2.1 和 3.3 版)

你可以从项目窗口上的样本和基因类型标签显示电泳图谱，以便检查数据。这些操作可始于项目窗口的样本标签（假设分析已完成）。

有关这些任务的详细内容，请参阅：

- *GeneMapper® ID 软件 3.3 版使用入门指南* (PN 4385329)。
- *GeneMapper® ID 软件 3.2 版用户通报安装操作程序和新功能* (PN 4352543)
- *GeneMapper® ID 软件 3.1 版个体识别分析用户指南* (PN 4338775)
- *GeneMapper® ID 软件 3.1 和 3.2 版个体识别教程* (PN 4335523)







本章包括：

概述 .....	5-2
准确度、精确度和可重现性 .....	5-3
电泳图上的额外峰 .....	5-17
位点特征描述 .....	5-26
物种特异性 .....	5-28
灵敏度 .....	5-30
稳定性 .....	5-32
混合物研究 .....	5-35
群体数据 .....	5-40
突变率 .....	5-55
一致性概率 .....	5-56
亲子排除概率 .....	5-57

## 概述

### 实验使用 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒

本章提供 Applied Biosystems 用 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒 (Sinofiler 试剂盒) 进行的产品开发验证实验结果。

### 验证的重要性

为个体识别目的而验证 DNA 分型程序是评价分型程序的效率、可靠性和性能特点。验证过程是以法医和亲子鉴定实验室内常用的样本检查分型程序，以便发现那些在案例鉴定中对于正确解释数据至关重要的属性和局限性 (Sparkes, Kimpton, Watson *et al.*, 1996; Sparkes, Kimpton, Gilbard *et al.*, 1996; Wallin *et al.*, 1998)。

### 实验条件

评价 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒性能的实验是在 Applied Biosystems 实施的。实验是根据 1998 年 10 月 1 日生效的 DNA 顾问委员会 (DAB) 质保标准 (DNA Advisory Board, 1998) 实施的。DAB 标准规定了实验室应该遵循的一些质保要求，以保证实验室数据的质量和完整性，并确保实验室的资格能力。

根据 DNA 分析方法科学工作小组修订后的指南 (SWGDM, 2003 年 7 月 10 日) 实施了额外验证。根据这些指南，Applied Biosystems 进行了符合指南 1.0 和 2.0 及相关内容的实验。这种 DNA 方法并不是新方法。(Moretti *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2001; Wallin *et al.*, 2002 和 Holt *et al.*, 2000)。

本章将讨论 Applied Biosystems 所实施的许多实验，并提供获得的结果范例。Applied Biosystems 精心选择条件，这些条件具有最高的 PCR 产物产率，并满足可重现性能标准的要求。这些实验为高品质试剂盒生产提供了足够的依据，但仍建议每个使用 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的实验室应该实施内部验证研究。

## 准确度、精确度和可重现性

**SWGDM 指南 1.2.1** “产品开发验证是证实由制造商、技术性组织、学术机构、政府实验室或第三方制订的程序的准确度、精确度和可重现性”。  
(SWGDM, 2003 年 7 月)

**SWGDM 指南 2.9** “应该确定同一样本的指定测量值组与其平均值的符合程度，以及这些测量值与测量的实际数值的匹配程度”。  
(SWGDM, 2003 年 7 月)

**准确度** 以激光诱导的荧光检测短串联重复序列基因位点的长度多态性并不是一种新方法 (Holt *et al.*, 2000 和 Wallin *et al.*, 2002)。AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的准确度和可重现性特点已用各种样本类型予以测定。图 5-1 显示的是样本等位基因和分型标准参照等位基因在 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪上使用 POP-4<sup>™</sup> 胶所观察到的典型的片段大小差异。第 5-4 页图 5-1 中的 X 轴代表 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的标称核苷酸片段大小。与 X 轴平行的虚线表示  $\pm 0.25$ -nt 窗口。Y 轴代表每个样本等位基因与相应的分型标准参照等位基因之间的的片段大小差异。所有样本等位基因与等位基因分型标准参照中的相应等位基因之间相差不超过  $\pm 0.5$  nt。

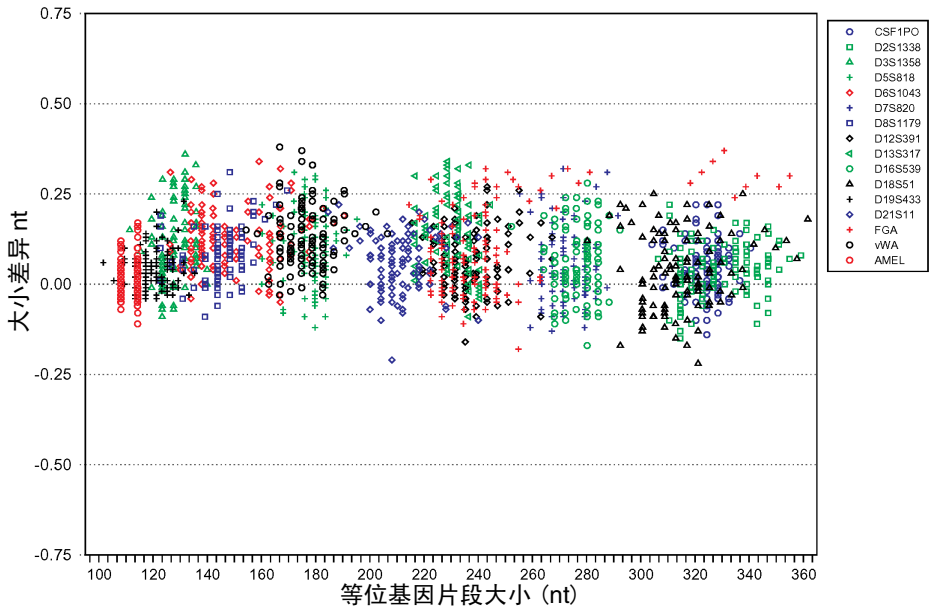


图 5-1 以 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪分析的 54 个样本的片段大小偏差

精确度和片段大小窗口

依靠片段大小测量精确度可以准确和可靠地确定基因型。以 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪测量了片段大小精确度。推荐的基因分型方法是，在 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 中等位基因分型标准参照中每个等位基因获得的片段大小附近使用一个  $\pm 0.5$ -nt “窗口”。通过这个  $\pm 0.5$ -nt 窗口，可以检测和纠正等位基因的定位。任何大小超出指定窗口的样本等位基因可能会是：

- 一个“非标准”等位基因，即片段大小不在 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照内的等位基因。

或

- 一个符合分型标准参照等位基因的等位基因，但由于测量误差其大小刚好超出窗口。

任何片段大小测量方法固有的测量误差，可以通过多次测量等位基因片段大小获得的精确度予以确定。等位基因在毛细管仪器上经多次进样分析或在一块琼胶的多泳道中电泳，可以通过计算从某等位基因获得的片段大小数值标准差测量精确度。

第 5-6 页表 5-1 显示的是五次电泳（每次使用 16 毛细管）获得的典型的精确度结果。分析以 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照在 Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪上（36-cm 毛细管和 POP-4<sup>™</sup> 胶）实施。使用的内标标准片段是 GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 片段标准。这些结果是在同一毛细管束上在一组进样中获得的。

由于测量误差，样本等位基因的片段大小可能会偶尔超出各自的分型标准参照等位基因的  $\pm 0.5$ -nt 窗口。这种情况最少见于那些片段大小测量标准差最小的检测系统。第 5-4 页图 5-1 显示的是在 Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪上获得的等位基因片段大小的紧密分簇。这种情况下片段大小测量标准差通常小于 0.15 nt。当片段大小测量标准差大约为 0.15 nt 或以下时，样本等位基因片段大小由于测量误差而超出  $\pm 0.5$ -nt 窗口的情况相对比较罕见（Smith, 1995）。

对于片段大小不在  $\pm 0.5$ -nt 窗口之内的样本等位基因，必须重新电泳 PCR 产物，以便区分是真正的非标准等位基因，还是分型标准参照等位基因相对的样本等位基因出现了测量误差。必要时重复分析可以为最终等位基因分配增加可信度。

GeneMapper<sup>®</sup> ID 软件 3.2.1 和以后版本能够自动标记那些片段大小不在分型标准参照等位基因规定窗口内的样本等位基因。

尽管琼胶或一组毛细管进样中的精确度非常好，不同平台上测得的等位基因片段大小仍会有所不同。造成不同平台出现片段大小差异的因素有很多，其中包括琼胶混合物的类型和浓度、电泳温度和电泳条件。由于这些因素，使用同一仪器做的电泳之间和使用不同仪器做的电泳之间都会出现片段大小差异。

Applied Biosystems 强烈建议，要将获得的等位基因片段大小与在同一分析中获得的 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照中的已知等位基因片段大小相比较，然后再转换成基因型（见第 4-2 页“使用之前”中的描述）。参阅表 5-1，了解 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳结果。欲了解精确度和基因分型的详细内容，请参阅 Lazaruk *et al.*, 1998 和 Mansfield *et al.*, 1998 的文献。

在表 5-1 中，计算了每次电泳（16 个毛细管）中所有等位基因的平均片段大小。在表格中显示的平均范围是五次电泳的最低和最高平均片段大小数值。同样，也计算了每次电泳中的所有等位基因的等位基因片段大小测量标准差。表 5-1 显示的标准差范围是五次电泳的最低和最高标准差数值。

**表 5-1 AmpF $\mathcal{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Sinofiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果**

Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
Amelogenin		
X	108.2–108.38	0.056–0.076
Y	114.33–114.52	0.047–0.073
CSF1PO		
6	304.11–304.52	0.054–0.083
7	308.15–308.56	0.057–0.084
8	312.21–312.6	0.042–0.075
9	316.26–316.64	0.041–0.073
10	320.3–320.66	0.055–0.0768
11	324.34–324.69	0.051–0.077
12	328.37–328.71	0.035–0.078
13	332.42–332.72	0.045–0.072
14	336.45–336.74	0.04–0.073
15	340.47–340.74	0.037–0.081
D12S391		
8	215.54–215.79	0.05–0.066
9	219.5–219.77	0.054–0.071



表 5-1 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
10	223.5–223.79	0.047–0.067
11	227.42–227.71	0.045–0.062
12	231.38–231.68	0.046–0.066
13	235.33–235.63	0.042–0.067
14	238.35–238.67	0.053–0.075
15	239.3–239.63	0.054–0.07
D13S317		
8	216.67–217.02	0.06–0.07
9	220.64–221.01	0.07–0.087
10	224.64–225.01	0.07–0.095
11	228.63–229.01	0.058–0.087
12	232.7–233.11	0.05–0.08
13	236.6–237	0.074–0.087
14	240.54–240.95	0.067–0.088
15	244.53–244.97	0.063–0.093
D16S539		
5	252.29–252.66	0.068–0.085
8	264.25–264.65	0.065–0.093
9	268.24–268.66	0.065–0.093
10	272.23–272.65	0.068–0.082
11	276.24–276.65	0.064–0.085

表 5-1 AmpF $\text{\textcircled{R}}$ STR $\text{\textsuperscript{TM}}$  Sinofiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳  
(每次电泳 16 个毛细管)的精确度结果 (续)

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
12	280.25–280.67	0.063–0.103
13	284.26–284.68	0.062–0.093
14	288.28–288.7	0.063–0.089
15	292.29–292.72	0.058–0.095
D18S51		
7	280.24–280.62	0.066–0.092
9	288.35–288.77	0.061–0.087
10	292.41–292.83	0.066–0.101
10.2	294.41–294.83	0.055–0.099
11	296.49–296.91	0.064–0.099
12	300.56–301	0.053–0.101
13	304.68–305.1	0.056–0.105
13.2	306.7–307.12	0.046–0.112
14	308.79–309.19	0.064–0.101
14.2	310.82–311.23	0.062–0.106
15	312.89–313.31	0.071–0.104
16	317–317.41	0.068–0.105
17	321.11–321.49	0.063–0.111
18	325.2–325.58	0.066–0.104
19	329.29–329.66	0.062–0.11
20	333.4–333.74	0.059–0.11
21	337.49–337.81	0.067–0.107

表 5-1 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
22	341.65–341.96	0.05–0.09
23	345.63–345.92	0.059–0.091
24	349.7–349.98	0.054–0.086
25	353.65–353.9	0.063–0.086
26	357.6–357.82	0.048–0.082
27	361.54–361.76	0.042–0.073
D19S433		
15	101.68–101.76	0.042–0.055
16	105.56–105.64	0.039–0.054
17	109.48–109.54	0.039–0.05
18	113.4–113.47	0.034–0.052
19	115.39–115.44	0.043–0.051
20	117.35–117.4	0.037–0.044
21	119.35–119.41	0.031–0.047
22	121.32–121.36	0.035–0.048
23	123.32–123.37	0.035–0.051
24	125.3–125.35	0.027–0.048
25	127.33–127.38	0.031–0.044
26	129.33–129.36	0.035–0.042
27	131.36–131.39	0.033–0.044
28	133.36–133.41	0.04–0.055

表 5-1 AmpF $\text{\textcircled{R}}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Sinofiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳  
(每次电泳 16 个毛细管)的精确度结果 (续)

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
D21S11		
24	184.54–184.72	0.049–0.069
24.2	186.53–186.71	0.039–0.061
25	188.49–188.67	0.039–0.067
26	192.42–192.59	0.041–0.066
27	196.38–196.54	0.036–0.047
28	200.23–200.39	0.042–0.051
28.2	202.21–202.38	0.036–0.049
29	204.2–204.36	0.042–0.046
29.2	206.24–206.42	0.041–0.049
30	208.21–208.38	0.034–0.053
30.2	210.18–210.37	0.028–0.049
31	212.22–212.38	0.036–0.052
31.2	214.18–214.37	0.042–0.061
32	216.19–216.38	0.037–0.052
32.2	218.17–218.38	0.035–0.055
33	220.18–220.4	0.04–0.057
33.2	222.12–222.34	0.038–0.048
34	224.25–224.47	0.048–0.058
34.2	226.16–226.39	0.042–0.056
35	228.24–228.47	0.046–0.053
35.2	230.15–230.39	0.04–0.064

表 5-1 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
36	232.14–232.39	0.044–0.053
37	236.21–236.46	0.043–0.054
38	240.15–240.38	0.049–0.059
D2S1338		
15	306.48–306.82	0.042–0.082
16	310.54–310.89	0.05–0.093
17	314.61–314.95	0.049–0.087
18	318.67–318.99	0.052–0.082
19	322.73–323.02	0.049–0.081
20	326.76–327.07	0.047–0.07
21	330.83–331.11	0.038–0.083
22	334.87–335.15	0.05–0.078
23	338.93–339.17	0.051–0.082
24	342.97–343.19	0.049–0.08
25	346.99–347.2	0.047–0.088
26	351–351.19	0.044–0.069
27	354.92–355.08	0.044–0.065
28	359.12–359.29	0.052–0.068
D3S1358		
12	111.45–111.62	0.047–0.071
13	115.54–115.73	0.051–0.072
14	119.53–119.7	0.044–0.08

表 5-1 AmpF $\Delta$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳  
(每次电泳 16 个毛细管) 的精确度结果 (续)

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
15	123.44–123.6	0.056–0.076
16	127.63–127.8	0.047–0.078
17	131.83–132.01	0.042–0.076
18	135.93–136.11	0.047–0.068
19	140.03–140.22	0.045–0.067
D5S818		
7	160.14–160.51	0.062–0.097
8	164.11–164.46	0.066–0.123
9	168.05–168.42	0.064–0.111
10	172.01–172.36	0.065–0.113
11	175.91–176.28	0.055–0.111
12	179.81–180.17	0.072–0.11
13	183.68–184.04	0.064–0.103
14	187.55–187.89	0.067–0.108
15	191.39–191.73	0.065–0.08
16	195.23–195.55	0.071–0.084
D6S1043		
9	126.37–126.61	0.069–0.096
10	130.22–130.47	0.064–0.091
11	134.13–134.38	0.071–0.084
12	138.08–138.33	0.065–0.088
13	142.26–142.55	0.058–0.087

表 5-1 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
14	146.48–146.79	0.062–0.098
15	150.8–151.12	0.068–0.101
16	154.98–155.34	0.064–0.102
17	159.04–159.44	0.074–0.117
18	163.01–163.42	0.061–0.134
19	166.96–167.36	0.066–0.132
20	170.87–171.28	0.081–0.143
21	174.78–175.19	0.075–0.121
21.3	177.66–178.07	0.073–0.12
22	178.67–179.09	0.078–0.121
23	182.61–183.03	0.082–0.116
24	186.48–186.9	0.074–0.125
25	190.42–190.83	0.077–0.105
D7S820		
6	255.26–255.68	0.053–0.082
7	259.27–259.71	0.066–0.084
8	263.32–263.74	0.058–0.089
9	267.34–267.79	0.055–0.085
10	271.36–271.82	0.06–0.101
11	275.4–275.86	0.066–0.098
12	279.43–279.9	0.063–0.09
13	283.48–283.95	0.063–0.092

表 5-1 AmpF $\text{STR}^{\text{®}}$  Sinofiler $^{\text{™}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳  
(每次电泳 16 个毛细管)的精确度结果 (续)

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
14	287.52–288	0.065–0.098
15	291.57–292.06	0.068–0.106
D8S1179		
8	122.88–123.03	0.051–0.065
9	126.94–127.1	0.047–0.06
10	131.05–131.2	0.053–0.071
11	135.17–135.32	0.046–0.072
12	139.37–139.53	0.049–0.071
13	143.95–144.16	0.049–0.067
14	148.43–148.66	0.044–0.067
15	152.8–153.04	0.053–0.07
16	157.05–157.34	0.058–0.086
17	161.23–161.53	0.058–0.112
18	165.33–165.64	0.059–0.098
19	169.38–169.71	0.054–0.112
FGA		
17	214.44–214.82	0.068–0.094
18	218.47–218.87	0.076–0.101
19	222.5–222.92	0.067–0.099
20	226.53–226.95	0.069–0.102
21	230.57–231	0.084–0.094
22	234.61–235.07	0.067–0.103



表 5-1 AmpF $\ell$ STR $^{\text{®}}$  Sinofiler $^{\text{™}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
23	238.65–239.11	0.074–0.102
24	242.69–243.16	0.073–0.114
25	246.74–247.23	0.078–0.119
26	250.79–251.29	0.079–0.109
26.2	252.8–253.32	0.07–0.121
27	254.8–255.32	0.072–0.114
28	258.85–259.38	0.075–0.118
29	262.92–263.46	0.081–0.117
30	267.01–267.56	0.081–0.119
30.2	268.84–269.39	0.08–0.13
31.2	272.91–273.48	0.081–0.13
32.2	276.99–277.56	0.09–0.14
33.2	281.06–281.64	0.079–0.134
42.2	318.17–318.74	0.089–0.141
43.2	322.29–322.85	0.091–0.145
44.2	326.41–326.95	0.083–0.148
45.2	330.53–331.07	0.089–0.136
46.2	334.53–335.06	0.078–0.13
47.2	338.62–339.12	0.084–0.144
48.2	342.77–343.24	0.083–0.147
50.2	350.88–351.3	0.07–0.121
51.2	354.83–355.24	0.074–0.125

表 5-1 AmpF $\text{STR}^{\text{®}}$  Sinofiler $^{\text{™}}$  等位基因分型标准参照的五次电泳（每次电泳 16 个毛细管）的精确度结果（续）

Applied Biosystems 3130xI 基因分析仪		
等位基因	平均	标准差
vWA		
11	154.27–154.51	0.059–0.07
12	158.44–158.7	0.052–0.087
13	162.57–162.84	0.047–0.1
14	166.8–167.09	0.057–0.099
15	170.72–171.01	0.053–0.101
16	174.75–175.04	0.059–0.098
17	178.73–179.02	0.05–0.098
18	182.68–182.96	0.057–0.094
19	186.64–186.9	0.039–0.081
20	190.56–190.84	0.064–0.075
21	194.46–194.71	0.053–0.085
22	198.35–198.59	0.053–0.068
23	202.2–202.45	0.055–0.076
24	206.51–206.79	0.052–0.069

## 电泳图上的额外峰

**额外峰的原因** 在电泳图上可能会检测到靶点等位基因以外的峰。出现额外峰的原因包括滑移产物、不完整的 3' A 核苷酸添加（在 n-1 位）置、荧光标记杂峰和混合的 DNA 样本（见 DAB 标准 8.1.2.2）。

### 滑移产物

滑移是一个特征完整的 PCR 杂峰，是指与主要 STR 产物相比小一个重复单位的小峰（或较少见的多一个重复单位的较大峰）（Butler, 2005; Mulero *et al.*, 2006）。对四核苷酸 STR 基因位点上滑移产物的序列分析表明，相对于主要等位基因，滑移产物遗失了一个四核苷酸核心重复单位（Walsh *et al.*, 1996）。

可以通过用滑移峰高除以主要等位基因峰高来测量滑移产物与主要等位基因的相对比例（滑移峰百分比）。在用于 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的位点上测量了扩增样本（n = 840）的峰高。所有数据产生于 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪。

来自于这些测量和观察的部分结论是：

- 对于每个 Sinofiler 试剂盒位点，滑移峰百分比通常随等位基因的长度而增加，见图 5-2 至图 5-5（第 5-18 页至 5-21）。
- 在每个位点内，相对于较长等位基因而言，较小的等位基因显示的滑移水平较低。
- 位点内的每个等位基因显示的滑移峰百分比是一致的。
- 每个位点观察到的最高滑移峰百分比包括在 GeneMapper<sup>®</sup> ID 软件 3.2.1 和以后版本的过滤步骤内。这些数据见于第 5-22 页表 5-2。如果滑移位置中的峰值高于观察到的滑移峰百分比，则不会被过滤。滑移位置中未被过滤并保留标签的峰将会被进一步评估。欲了解混合样本的评估，请参见第 5-35 页“混合物研究”。
- 测量那些超高峰的滑移峰百分比，结果可能异乎寻常地高。

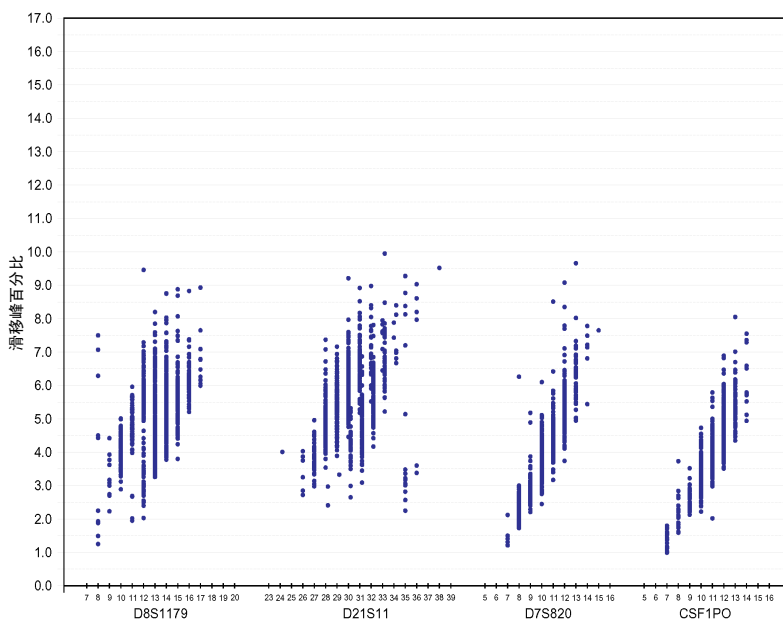


图 5-2 D8S1179、D21S11、D7S820 和 CSF1PO 位点的滑移峰比值

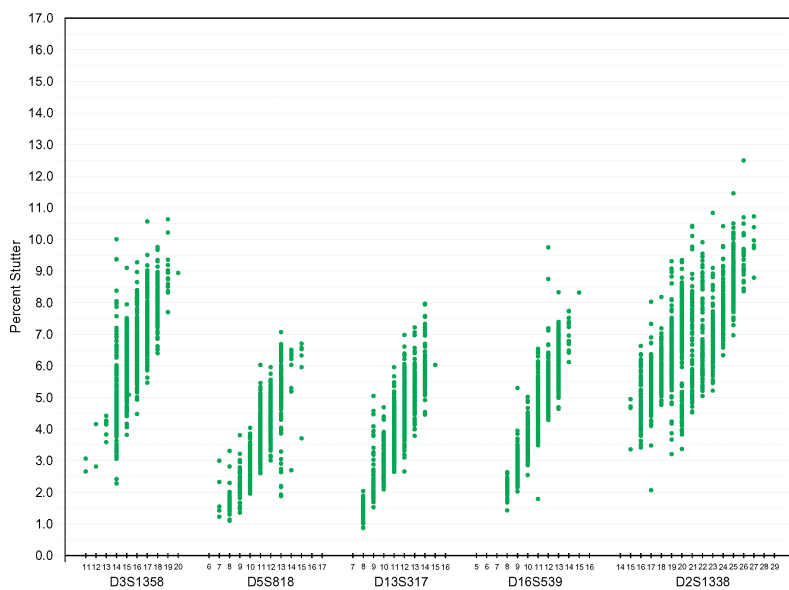


图 5-3 D3S1358、D5S818、D13S317、D16S539 和 D2S1338 位点的滑移峰比值

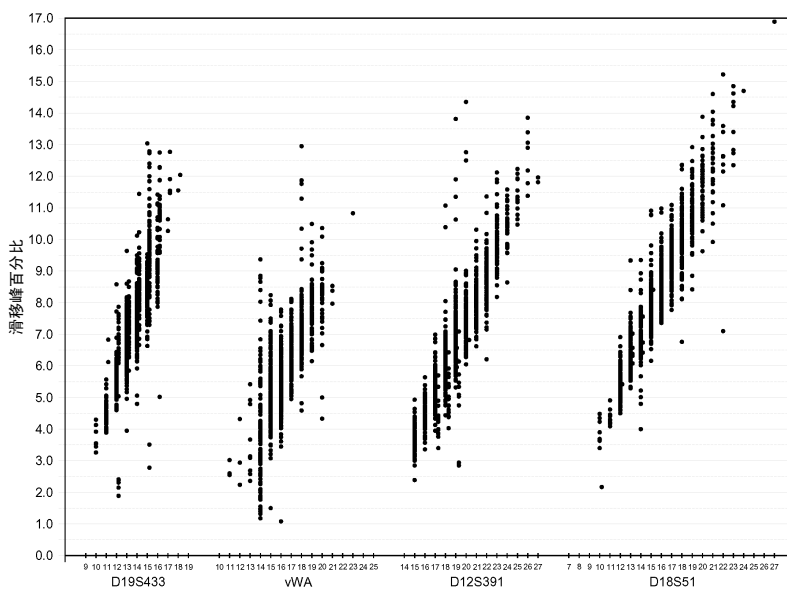


图 5-4 D19S433、vWA、D12S391 和 D18S51 位点的滑移峰比值

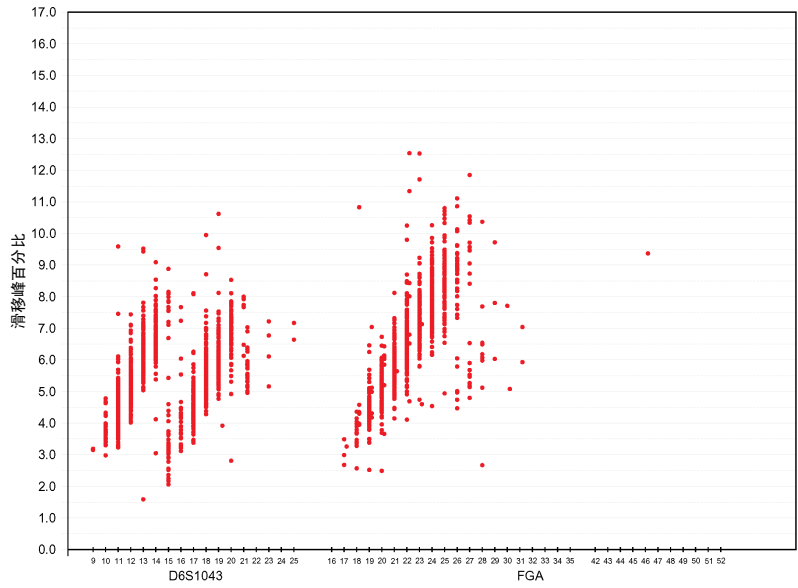


图 5-5 D6S1043 和 FGA 位点的滑移峰比值

表 5-2 Sinofiler 试剂盒位点特异性滑移峰比值 GeneMapper ID AmpFLSTR\_Sinofiler\_panels\_v1 使用的比率)

位点	滑移 %
CSF1PO	8.5
D12S391	14.5
D13S317	8
D16S539	10
D18S51	16
D19S433	13.5
D21S11	10
D2S1338	13
D3S1358	11
D5S818	7.5
D6S1043	11
D7S820	10
D8S1179	9.5
FGA	13
vWA	13.5



### 添加 3' A 腺苷酸

同其它许多 DNA 聚合酶一样 AmpliTaq Gold® 酶具有催化作用，可以将单一核苷酸（主要是腺苷酸）添加到双链 PCR 产物的 3' 端（Clark, 1988; Magnuson *et al.*, 1996）。这种无模板添加是 PCR 产物较实际靶点序列长出一个核苷酸。多带一个腺苷酸的 PCR 产物被称之为 "+A" 形式。

+A 添加的效率与 PCR 产物 3' 端处 DNA 的特定序列有关。Sinofiler 试剂盒包括两种主要设计特征，可以最大程度地促进 +A 添加：

- 引物序列已被优化，以便于 +A 添加。
- 最终延伸步骤是 60 °C，60 分钟。

最终延伸步骤可以给 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶以额外的时间来完成添加 +A 到所有双链 PCR 产物上。尚未为 +A 添加而优化的 STR 系统（在此系统上每个等位基因有两个峰，两峰之间有一个腺苷酸相隔）可能会有“分裂峰”。

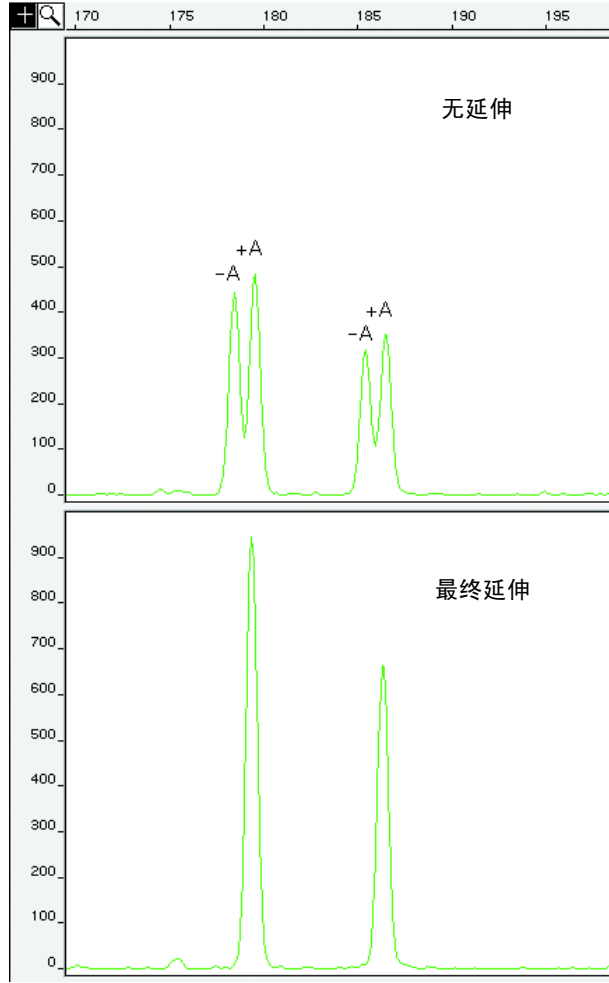


图 5-6 省略最终延伸步骤会因为 A（腺苷酸）添加不完全而造成分裂峰。数据来自 ABI PRISM<sup>®</sup> 310 基因分析仪，使用的是另外一个 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> 试剂盒。

当加入的 DNA 量大于方案推荐的量，在 Sinofiler 试剂盒结果中可能会观察不到完整的 +A（腺苷酸）添加，这是因为随着产生更多的 PCR 产物，AmpliTaq Gold DNA 聚合酶需要更多的时间才能将 +A（腺苷酸）添加到所有分子上。扩增加入太多的 DNA 还可能会造成数据超出标准。

**杂峰** 所有的分子生物学系统都可发生假阳性和反常情况。可造成假阳性的杂峰通常是可以重复的，但反常情况是不可以重复、间断性发生的，不会持续在一个系统上观察到。如钉子峰和基线噪音。当使用 Sinofiler 试剂盒时，可以在基因分析仪产生的数据中见到杂峰。在扩增的样本中，非检测区内的杂峰可能出现在蓝色（95–100 nt）荧光标记中。检测区内的低水平杂峰可能出现在蓝色（118 nt）、绿色（97、120 和 189 nt）和黑色（95–100、164 nt）荧光标记中，取决于仪器的灵敏度。

第 5-25 页图 5-7 显示的是一些使用 Sinofiler 试剂盒时在电泳图上出现的基线噪音和杂峰。基因分型时可能会将这些杂峰作为非标准等位基因检测，或“OL 等位基因”。解释数据时，你应该考虑到可能的噪音和杂峰。

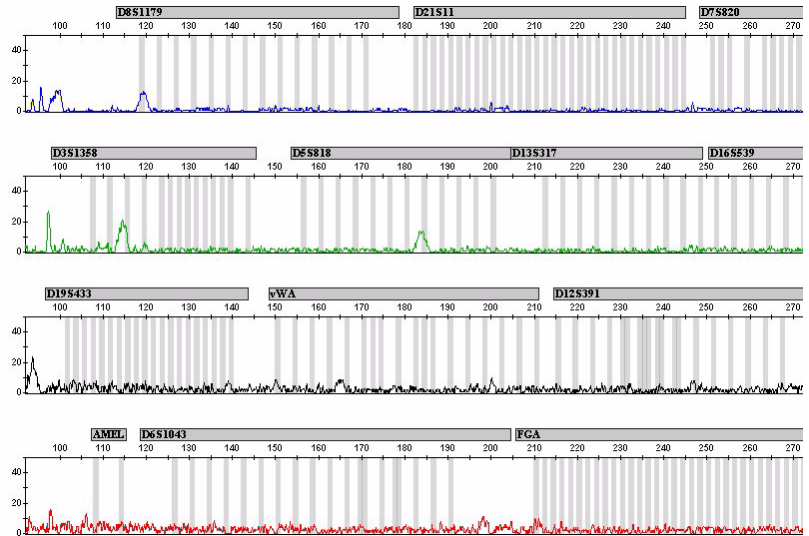


图 5-7 Applied Biosystems 3130x/ 基因分析仪产生的数据中的基线噪音和可重现性杂峰范例

注意，使用了高度放大倍数（Y-轴），以便显示这些杂峰。

## 位点特征描述

### SWGDM 指南 2.1

“一个遗传标记的基本特征必须被确定和记录”。(SWGDM, 2003年7月)

本章节描述 15 位点和性别决定位点 *Amelogenin* 的基本特征, 这些位点以 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒予以扩增。这些位点的特征早已被其它实验室广泛描述。

#### 多态性特性

从 X 染色体上扩增的产物包含一个 6-核苷酸缺失。扩增会分别在 X 和 Y 染色体上产生 107-nt 和 113-nt 产物。(根据序列分析结果, 片段大小是实际核苷酸的片段大小, 其中包括 3' A 核苷酸添加) 其余的 Sinofiler 试剂盒位点都是四核苷酸短串联重复 (STR) 位点。特定位点等位基因的长度差异源自 4-nt 重复单位数量的差异。

以 Sinofiler 试剂盒扩增的位点 D6S1043 和 D12S391 是复合 STR 位点。D6S1043 等位基因内含重复单位序列 (ATCT) 和 (ATGT), 两者在数量和重复区内的相对位置可略有不同。最常见的重复基序 (ATCT) 被称之为核心重复序列。D12S391 位点由 (AGAT)<sub>x</sub>(AGAC)<sub>y</sub>(AGAT)<sub>z</sub> 的重复性基本结构组成。在这两个位点上, 重复区和等位基因分布内的序列变异已被广泛报道 (Chen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004; Glock *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2004; Junge 和 Madea, 1998; Klintschar *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2004; Waiyawuth *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2003)。

Applied Biosystems 对 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 等位基因分型标准参照中的所有等位基因实施序列分析。另外, 其它科研团体已对这些位点中的某些位点上的等位基因实施了序列分析。在 Sinofiler 试剂盒位点的各种序列数据中, 对于 STR 的重复模式和结构的结论是一致的。

#### 遗传

欧洲人类多态性研究中心 (CEPH) 已收集了犹他摩门人、法属委内瑞拉人和阿米什人后代家族的 DNA。这些 DNA 组已在世界范围内被广泛研究, 被常规性地用于描述各种 DNA 位点的遗传模式特征。每个家族的 DNA 组含有三代人的 DNA, 通常是四位祖父母、两位父母和数位子女。因此, CEPH 家族 DNA 组对于研究遗传模式十分理想 (Begovich *et al.*, 1992)。

三个 CEPH 家族 DNA 组已被研究。来自每个样本的 1 ng DNA 以 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒扩增，然后用 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪予以分析。被研究的家族包括 1333 号（9 位子女）、1340 号（7 位子女）和 1345 号（7 位子女），代表着 23 次减数分裂。

在 1340 号家族中，我们在两对父母 / 后代的 D8S1179 位点上观察到突变。在 1333 号家族中，在 D12S391 位点上观察到一种突变。两代之间的基因型只有一个重复单位不同。这些样本被以 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 和 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> 试剂盒再次扩增，以便确认等位基因识别。由于样本过少，基于这些数据计算的突变率是不准确的。不出所料，其它父母-子女等位基因转移符合孟德尔规则。

**定位** Sinofiler 试剂盒所行包含位点都已被定位，在染色体上的位点已被报道。（Nakahori *et al.*, 1991 ; Edwards *et al.*, 1992 ; Kimpton *et al.*, 1992 ; Kong *et al.*, 2004 ; Lareu *et al.*, 1996 ; Mills *et al.*, 1992 ; Sharma 和 Litt, 1992 ; Li *et al.*, 1993 ; Straub *et al.*, 1993 ; Barber 和 Parkin, 1996）。

# 物种特异性

## SWGAM 指南 2.2

“应该评价用人类 DNA 分型方法从与法医学相关的非人类物种材料中检测 DNA 的可能性”。(SWGAM, 2003 年 7 月)

AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒具有检测灵长类等位基因所需要的特异性。对于其它物种，要检测的位点不能扩增。

### 非人类研究

法医案例样本中可能会存在非人类 DNA。用 Sinofiler 试剂盒检测非人类 DNA 的实验数据见图 5-8。

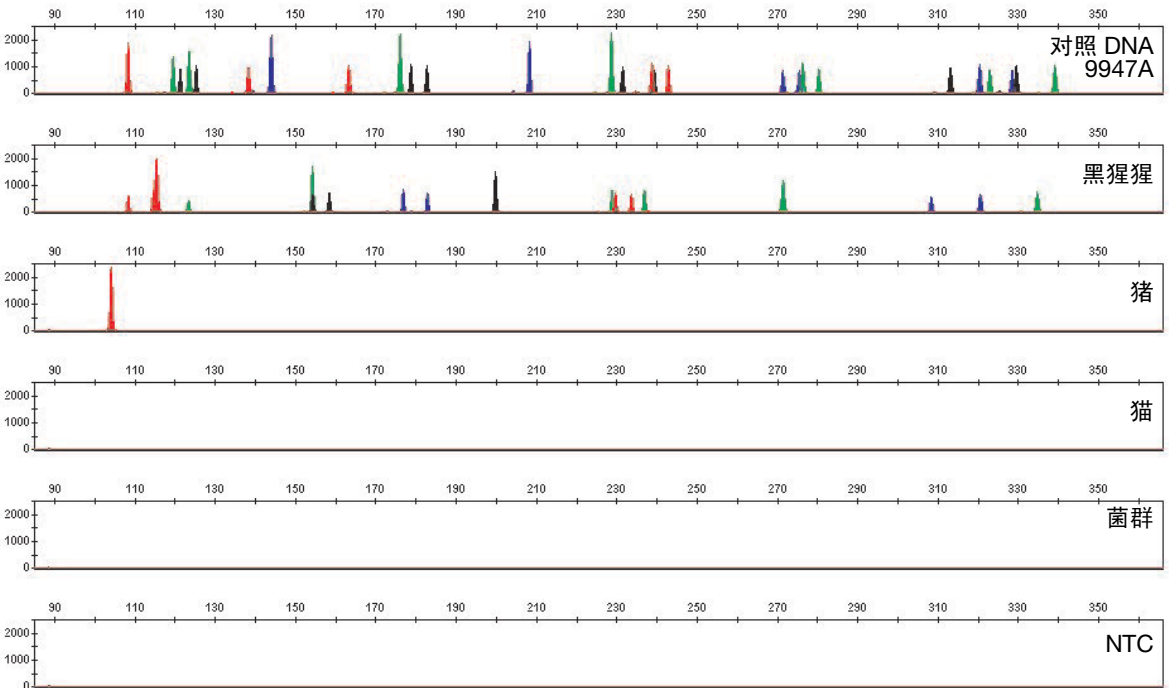


图 5-8 物种特异性研究的代表性电泳图包括阳性和非模板对照 NTC

第 5-28 页图 5-8 显示以下扩增对照 DNA 9947A (1 ng 第 1 组)、黑猩猩 (1 ng 第 2 组)、猪 (10 ng 第 3 组)、猫 (10 ng 第 4 组)、菌群 DNA (相当如  $10^5$  拷贝白色念珠菌、淋病奈瑟菌、大肠杆菌 0157:H7、枯草杆菌和鼠李糖乳杆菌第 5 组) 和阴性对照第 6 组。以 Sinofiler 试剂盒扩增提取的 DNA 样本, 然后用 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪分析。

- 灵长类: 大猩猩、黑猩猩、猩猩和猕猴 (每种 1 ng)
- 非灵长类: 大鼠、狗、猪、猫、马、仓鼠、大鼠、鸡和牛 (每种 10 ng)
- 微生物: 白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、枯草杆菌和鼠李糖乳杆菌 (相当如  $10^5$  拷贝)

所有灵长类 DNA 样本均被扩增, 在 100 至 400 碱基对区域产生片段 (Lazaruk, *et al.*, 2001; Wallin, *et al.*, 1998)。

微生物、鸡、猫、仓鼠、大鼠和小鼠未产生可检测出的产物。马、牛、狗和猪在 PET<sup>®</sup> 荧光标记中的 Amelogenin 位点附近产生了一个 104-bp 片段。

## 灵敏度

### SWGDM 指南 2.3

“如果适合，应该确定可以产生可靠基因分型结果的 DNA 数量范围”。（SWGDM，2003 年 7 月）

#### 定量的重要性

AmpF $\Lambda$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒的最佳 DNA 加入量应该在 0.50 和 1.25 ng 之间。在扩增之前，应使用 Quantifiler<sup>®</sup> 人类 DNA 定量试剂盒（PN 4343895）对 DNA 样本进行定量。最终 DNA 浓度应该在 0.05 至 0.125 ng/ $\mu$ L 之间，以保证有 0.50 至 1.25 ng 的 DNA 以 10  $\mu$ L 的容积被加到 PCR 反应中。如果样本含有降解的 DNA，加入额外的 DNA 实施扩增可能会有所帮助。在第 5-31 页图 5-9 中，对照 DNA 9947A 由 1 ng 被系列稀释至 0.062 ng。在 0.125 ng 持续获得了（27 个 PCR 产物）全部位点图谱，但在 0.062 ng 只能偶尔获得部分图谱（遗失 1 至 3 个等位基因）。

#### DNA 数量对结果的影响

如果在 PCR 反应中加入过多 DNA 增加的 PCR 产物量会导致

- 超过以仪器检测所需线性动态范围的荧光强度超高数据。超高数据可造成如下问题：
  - 超高峰的定量（峰高和面积）不准确。例如，超高的等位基因峰可造成相应的滑移峰相对强度增高，使计算的滑移峰百分比增加。
  - 超高数据的多组分分析不准确。这种不准确可造成光谱分离不佳（“色谱交叉杂峰”）。
- 不完整的 +A（腺苷酸）添加  
可以用较少的 DNA 重新扩增样本。

当添加到 PCR 的等位基因拷贝总数特别低时，会由于随机浮动而发生等位基因的不平衡扩增。

某些实验室可能会发现，根据他们自己的结果和仪器，使用较低的 DNA 加入量确定适宜的最低峰高阈值非常有用。



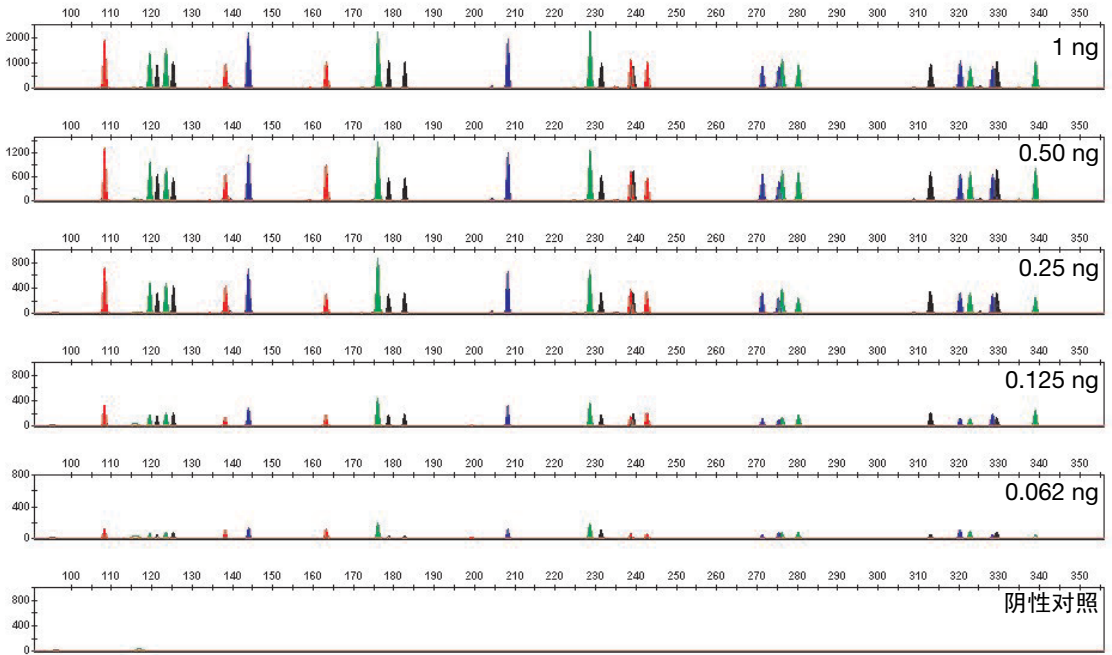


图 5-9 扩增不同数量对照 DNA 9947A 的影响和阴性对照

注意，已为较低的 DNA 数量而放大 Y 轴的尺度，是以 Applied Biosystems 3130*xl* 基因分析仪分析的

## 稳定性

### SWGDM 指南 2.4

“从经历了各种环境和化学侵蚀的各种生物学样本中获取 DNA 检查结果的能力已有广泛记录。在多数情况下，不需要评定这些因素对新法医 DNA 程序的影响。然而，如果底物和 / 或环境 / 和 / 或化学侵蚀可能会影响分析过程，则应该用已知样本评定分析过程，以便确定这些因素的影响。”（SWGDM，2003 年 7 月）

#### 降解的 DNA

由于降解的 DNA 的平均片段大小与靶点序列的片段大小相近，使扩增所需的片段大小范围内的完整模板数量下降，这样产生的 PCR 产物量会有所降低。

制备了降解的 DNA 以用来检测潜在的被优先扩增的位点。高分子量 Raji DNA 经过超声波处理后，用增量的 DNase I (0 至 6 单位) 保温 20 分钟 (Bender 等人, 2004)。用毛细管电泳分析方法检查 DNA，以确定各时间点上的 DNA 片段平均片段大小。

一纳克降解的 DNA 被用来做 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒扩增。随着 DNA 被不断降解，较大的位点将无法检测到 (第 5-33 页图 5-10)。

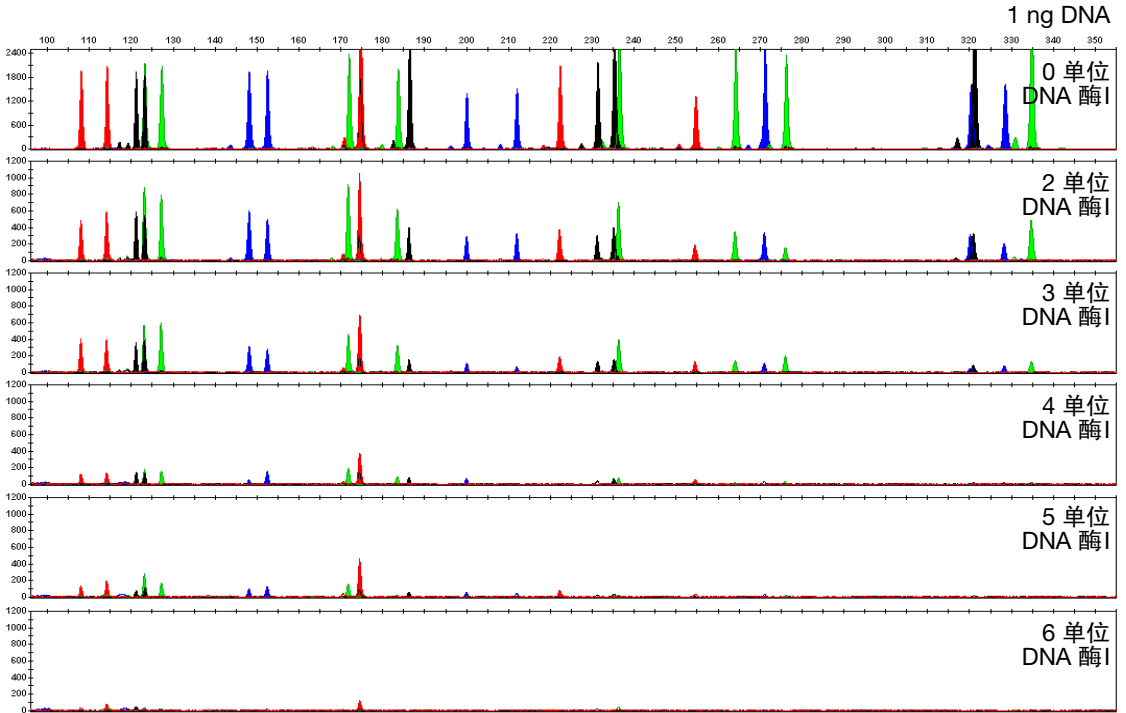


图 5-10 扩增先以超声波处理再以 0、2、3、4、5 和 6 单位 DNA 酶 I 处理的 1-ng Raji DNA 样本

### 抑制剂血红素的影响

血红素类化合物已被确定为从血斑中提取的 DNA 样本的 PCR 抑制剂 (DeFranchis *et al.*, 1988; Akane *et al.*, 1994)。据报道, 该抑制剂是与 DNA 一起被提取和净化的, 随后会通过抑制聚合酶活性而干扰 PCR。

欲检查血红素对以 Sinofiler 试剂盒获得的扩增结果的影响, 用浓度逐渐增高的血红素对男性 DNA 007 (加入 1 ng) 予以扩增: 0  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、60  $\mu\text{M}$  和 70  $\mu\text{M}$  (第 5-34 页图 5-11)。在有浓度逐渐增高的血红素时, 未观察到希望的扩增。

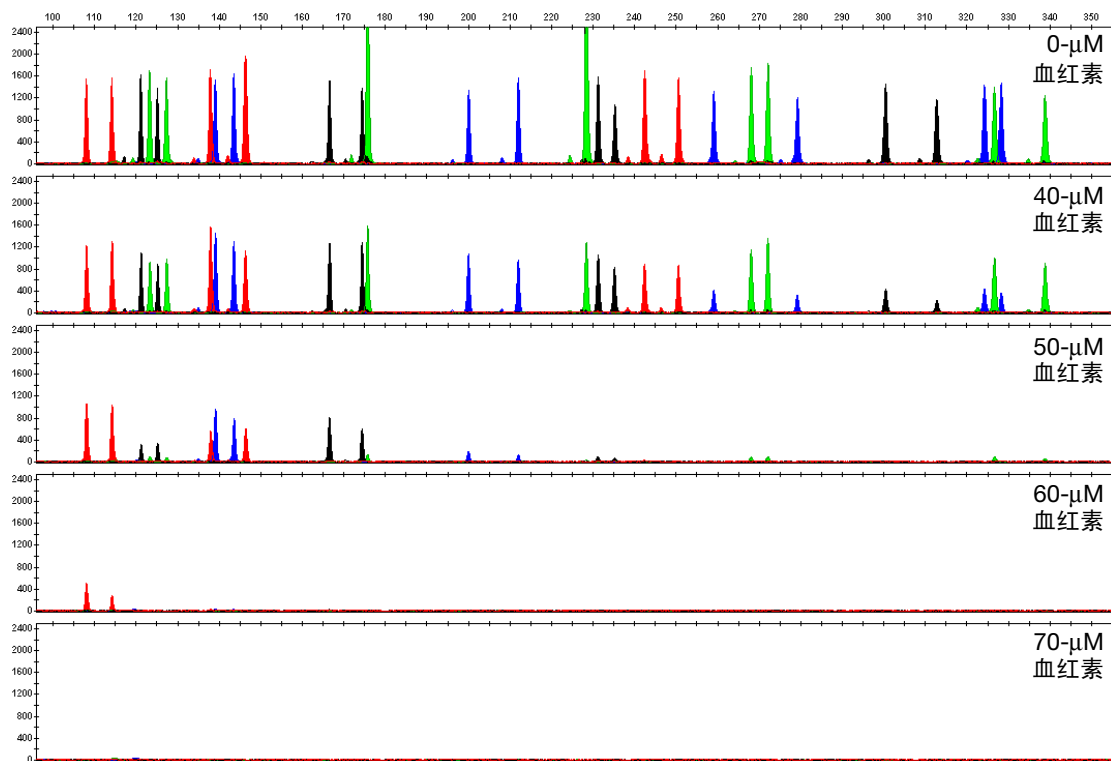


图 5-11 在血红蛋白浓度变化的情况下以 AmpF $\Lambda$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒扩增，再以 Applied Biosystems 3130xl 基因分析仪分析。

## 混合物研究

**SWGDM 指南 2.8** “应该确定从混合样本中获得可靠结果的能力”。（SWGDM, 2003 年 7 月）

作为证据的样本中可能含有来自一人以上的 DNA。解释结果时，应该考虑到有多个 DNA 来源的可能性。Applied Biosystems 建议，各实验室应根据本实验室内实施的验证实验规定一个最低峰高阈值。这样可以在随机效应可能会干扰准确解释混合物结果时，避免分型错误。

**混合物研究** 作为证据的样本含有来自一个以上个体的体液和 / 或组织，这在法医案例中十分常见。因此，确保 DNA 分型系统必须能够检测 DNA 混合物至关重要。可以通过多种方法将混合样本与单一样本区分开。

- 在一个位点上有两个以上等位基因
- 在滑移位置上出现峰，其明显高于一般在单一样本上观察到的百分比
- 对于一个异源基因型来说明显不平衡的等位基因

峰高比是以较低峰高（以 RFU 为单位）除以较高峰高（以 RFU 为单位）所获得的百分比。观察到的非混合群体数据库样本 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒位点上等位基因的平均、中间、最低和最高峰高比见 表 5-3:

表 5-3 加入 1 ng DNA 的峰高比

等位基因	观察数量 (n)	平均	中间	最低	最高
CSF1PO	581	88.8	90.4	55.8	99.9
D12S391	688	87.9	89.2	57.4	100
D13S317	590	88.4	89.3	59.5	99.9
D16S539	621	88.6	89.8	52.4	100
D18S51	703	87.6	88.3	57.5	100
D19S433	637	89.8	90.6	62.6	100
D21S11	689	89.4	90.8	62.3	100
D2S1338	702	87.2	88.8	45.1	99.9
D3S1358	584	90.5	92.0	57.5	99.9
D5S818	575	89.9	91.3	62.0	100
D6S1043	674	90.0	91.5	61.9	100
D7S820	646	88.6	89.9	50.6	100
D8S1179	643	89.8	91.0	58.9	100
FGA	683	88.4	89.7	54.2	100
vWA	664	89.5	91.0	63.9	100

如果在某位点观察到异常低的峰高比但没有其它指标说明样本是混合物，可以重新扩增并重新分析样本以确定是否可以重现这一不平衡现象。某位点出现不平衡现象的可能原因有：

- 降解的 DNA
- 有抑制剂
- DNA 加入量极低
- 其中一个引物结合点上有 SNP
- 某个等位基因含有罕见的序列，该序列无法象其它序列一样被扩增。

### 混合样本基因分型确定方法

如果样本含有来自两个来源的 DNA，会影响（在一个位点上）下列七种基因型组合的任何一种（如下所示）。

- 杂合子 + 杂合子，无重叠的等位基因（四个峰）
- 杂合子 + 杂合子，一个重叠的等位基因（三个峰）
- 杂合子 + 杂合子，两个重叠的等位基因（两个峰）
- 杂合子 + 纯合子，无重叠的等位基因（三个峰）
- 杂合子 + 纯合子，有重叠的等位基因（两个峰）
- 纯合子 + 纯合子，无重叠的等位基因（两个峰）
- 纯合子 + 纯合子，无重叠的等位基因（一个峰）

某混合物内含样本的特定基因型组合和加入 DNA 比率决定了是否可以确定某单个位点上主要和次要成分的基因型。

能够在 Applied Biosystems 的仪器上获得和比较不同等位基因峰高的定量数值，这为确定混合基因型提供了另外一种方法。与在染色琼胶上比较条带相对强度相比，定量数值是一种相对比较客观的方法。

归根到底，必须由分析人员根据具体案例情况判断样本在多大程度上是一种混合物，其中包括通过已知参考样本获得的信息。

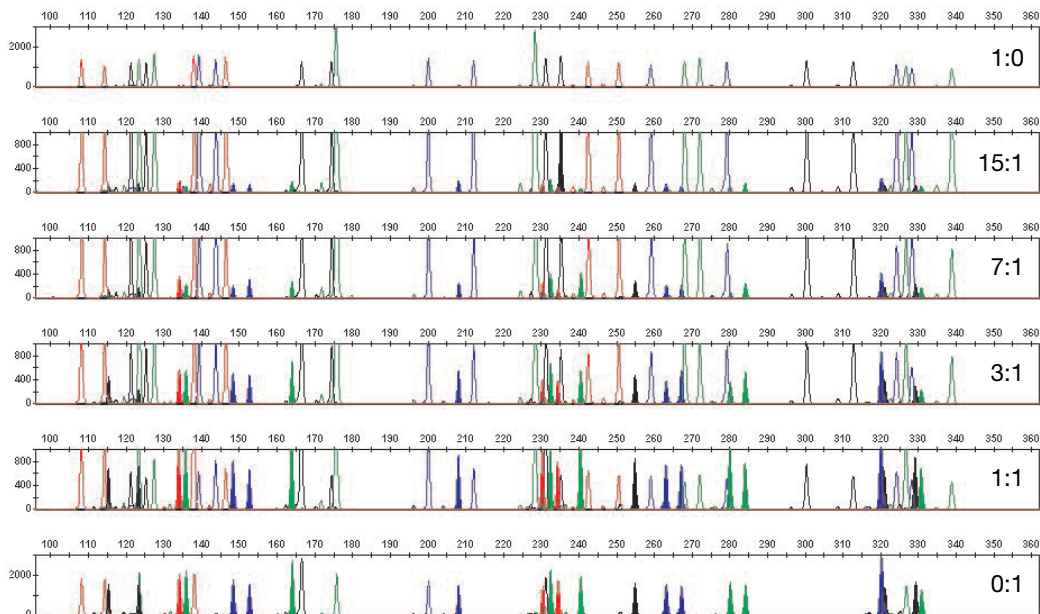


图 5-12 各种比率下 DNA 混合物的扩增

#### 次要成分检测的局限性

两种 DNA 样本的混合物在各种比率 (0:1、1:1、3:1、7:1、15:1、1:0) 下予以检测。以每种比率混合的基因组 DNA 加入总量为 1 ng。将样本在 GeneAmp® PCR 系统 9700 上予以扩增，然后电泳，再用 Biosystems 3130xI 基因分析仪检测。

混合 DNA 样本的检测结果见图 5-12，其中样本 A 和 B 根据指定的比率予以混合。无重叠位点处的次要成分等位基因识别被突出显示。次要成分按 3:1 和 7:1 (0.875:0.125 ng) 混合比率扩增已可以分析其基因型。比率 15:1 通常会导致只获得次要成分的部分图谱。



表 5-4 显示第 5-38 页图 5-12 中样本的图谱。

表 5-4 混合 DNA 样本的基因型

等位基因	样本 A 图谱 (对照 DNA 007)	样本 B 图谱
D8S1179	12, 13	14, 15
D21S11	28, 31	28, 30
D7S820	7, 12	8, 9
CSF1PO	11, 12	10
D3S1358	15, 16	15, 18
D5S818	11	8, 11
D13S317	11	12, 14
D16S539	9, 10	12, 13
D2S1338	20, 23	20, 21
D19S433	14, 15	12.2, 14.2
vWA	14, 16	14
D12S391	18, 19	18, 24
D18S51	12, 15	17, 19
Amelogenin	X, Y	XY
D6S1043	12, 14	11, 12
FGA	24, 26	21, 22

Sinofiler 试剂盒已经过优化，可以可靠地扩增和分析大约 0.50 至 1.25 ng 的单源 DNA 基因型。

## 群体数据

**SWGDM 指南 2.7** “应该在相关人群中确定群体的基因位点分布”。  
(SWGDM, 2003年7月)

**概述** 欲解释已判定基因型的样本之间匹配的意义，必须了解欲调查位点上的等位基因在群体中的分布情况。如果作为相关证据样本的基因型与疑犯参考样本的基因型不同，那么就可以排除所测试的生物学证据来自疑犯。这种排除与两种基因型在群体中出现的频率无关。

如果疑犯和证据样本有相同基因型，那么疑犯就可以被列为证据样本的可能来源。可以通过此基因型在相关人群中出现频率来估计另外一位无血缘关系的个体也与证据样本相匹配的机率。

### 这些研究中使用的群体样本

用 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler PCR 扩增试剂盒来产生本章节使用的群体数据。样本采集来自整个美国的个体，而没有地区偏好。

按位点分析了三个数据库中共 2034 条染色体，结果发现以下不同等位基因的数目：8 个 CSF1PO 等位基因、14 个 D2S1338 等位基因、12 个 D3S1358 等位基因、9 个 D5S818 等位基因、25 个 D6S1043 等位基因、12 个 D7S820 等位基因、11 个 D8S1179 等位基因、21 个 D12S391 等位基因、10 个 D13S317 等位基因、8 个 D16S539 等位基因、23 个 D18S51 等位基因、19 个 D19S433 等位基因、24 个 D21S11 等位基因、28 个 FGA 等位基因和 12 个 vWA 等位基因。

使用 HW-QuickCheck 软件通过精确测试检查了每个样本人群中观察到的基因频率与 Hardy-Weinberg 期望值 (HWE) 的符合程度 (Bonferroni, 1936; Guo 和 Thompson, 1992, Kalinowski, 2006)。除非洲裔美国人中的 D6S1043、亚洲裔美国人中的 D3S1358、高加索裔中的 D19S433 和西班牙裔中的 D12S391 外，所有 STR 的  $p$  值均  $>0.05$ 。考虑到 Bonferroni 操作程序和同一人群样本中同时做 15 个 HWE 测试这一事实，差异性阈值被从 0.05 调整到  $0.05/15 = 0.0033$ ，此数值明显低于在这些位点上观察到的  $p$  值。因此，与 HWE 之间的差异并不显著。

除观察到和在 Applied Biosystems 数据库中记录的等位基因外，其它已知基因已有报道或由其它实验室报告到 Applied Biosystems（见 STRBase <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase>）。

**AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup>  
Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒  
等位基因频率**

表 5-5 显示 AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒等位基因在四种人群中的频率，按百分比计算。

表 5-5 AmpF $\ell$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
CSF1PO				
6	‡	‡	‡	‡
7	5.56	0.68 <sup>‡</sup>	‡	0.95 <sup>‡</sup>
8	6.98	0.45 <sup>‡</sup>	0.37 <sup>‡</sup>	0.71 <sup>‡</sup>
9	4.44	4.32	2.21	2.37
10	24.44	22.95	29.04	23.70
11	23.65	25.91	29.60	30.81
12	27.30	37.73	29.96	36.97
13	6.83	6.82	7.90	3.55
14	0.79	0.68 <sup>‡</sup>	0.92	0.95 <sup>‡</sup>
15	‡	‡	‡	‡
<i>p</i> 值	0.07	0.19	0.35	0.18
D12S391				
13	‡	‡	‡	0.24 <sup>‡</sup>
14	‡	‡	‡	‡
15	6.03	0.68 <sup>‡</sup>	4.60	4.74
16	6.51	0.45 <sup>‡</sup>	2.39	5.92

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
17	15.87	5.91	10.11	5.92
17.1	0.32 <sup>†</sup>	‡	‡	‡
17.3	0.48 <sup>†</sup>	‡	2.21	1.42
18	25.71	24.55	15.62	17.54
18.3	0.95	0.45 <sup>†</sup>	2.02	1.90
19	16.98	18.18	10.66	18.25
19.1	0.63 <sup>†</sup>	‡	‡	‡
19.3	0.16 <sup>†</sup>	‡	0.55 <sup>†</sup>	2.84
20	10.95	17.5	12.32	13.51
20.3	‡	0.23 <sup>†</sup>	0.37 <sup>†</sup>	0.24 <sup>†</sup>
21	6.83	10.68	13.05	10.66
22	3.33	9.32	13.42	9.24
23	2.06	5.91	8.46	3.55
24	1.90	3.18	2.76	1.18
25	1.11	1.59	0.92	1.90
26	0.16 <sup>†</sup>	0.23 <sup>†</sup>	0.55 <sup>†</sup>	0.71 <sup>†</sup>
27	‡	0.45 <sup>†</sup>	‡	0.24 <sup>†</sup>
28	‡	0.23 <sup>†</sup>	‡	‡
$\rho$ 值	0.45	0.20	0.37	0.0287 <sup>#</sup>
D13S317				
6	‡	0.23 <sup>†</sup>	‡	‡
7	‡	0.23 <sup>†</sup>	‡	‡

表 5-5 AmpF $\phi$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
8	3.81	29.32	9.74	8.77
9	1.59	11.82	5.70	14.93
10	3.02	15.91	7.35	9.24
11	30.48	22.73	29.78	24.17
12	44.92	14.55	30.70	27.49
13	11.90	4.09	11.76	10.43
14	3.97	0.45 <sup>‡</sup>	4.96	4.98
15	0.32 <sup>‡</sup>	0.23 <sup>‡</sup>	‡	‡
<i>p</i> 值	0.38	0.20	0.23	0.19
D16S539				
5	‡	‡	‡	‡
8	3.65	0.45 <sup>‡</sup>	1.10	2.37
9	20.48	27.27	12.32	11.37
10	10.79	17.27	4.96	14.22
11	30.79	24.77	32.35	30.09
12	17.14	19.77	28.49	26.54
13	15.56	9.32	19.12	14.45
14	1.59	0.68 <sup>‡</sup>	1.47	0.95 <sup>‡</sup>
15	‡	‡	0.18 <sup>‡</sup>	‡
<i>p</i> 值	0.06	0.45	0.13	0.40
D18S51				
7	‡	‡	‡	‡

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
9	‡	‡	‡	0.24‡
10	0.16‡	‡	1.10	0.24‡
10.2	0.16‡	‡	‡	‡
11	0.48‡	1.14	0.74‡	0.71‡
12	5.40	5.91	14.52	9.00
12.2	‡	‡	0.18‡	‡
13	4.60	15	13.05	15.17
13.2	0.79	‡	‡	‡
14	6.67	18.18	16.36	13.03
14.2	0.32‡	‡	‡	‡
15	18.73	22.95	11.40	10.90
15.2	‡	‡	‡	0.24‡
16	16.83	14.55	14.15	15.40
17	15.71	7.27	12.13	15.40
18	11.43	4.09	9.01	8.77
19	9.52	2.73	4.41	3.79
20	5.24	2.05	1.47	2.13
21	3.02	2.73	0.55‡	2.61
22	0.79	1.82	0.18‡	0.95‡
23	0.16‡	0.68‡	0.55‡	0.95‡
24	‡	0.45‡	‡	0.24‡
25	‡	‡	0.18‡	‡

表 5-5 AmpF $\phi$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
26	‡	‡	‡	‡
27	‡	‡	‡	0.24‡
$\rho$ 值	0.37	0.55	0.39	0.41
D19S433				
9	‡	0.23‡	‡	‡
10	0.95	‡	‡	0.24‡
11	8.57	‡	0.18‡	1.18
11.2	0.16‡	‡	‡	0.24‡
12	11.43	3.86	8.64	7.11
12.1	‡	‡	0.18‡	‡
12.2	4.60	0.91‡	‡	1.18
13	26.67	32.05	26.10	23.22
13.2	4.92	3.64	1.10	5.69
14	20.79	21.14	33.64	25.83
14.2	4.92	12.05	2.76	5.69
15	6.51	5.45	16.91	14.45
15.2	4.76	16.14	2.21	9.24
16	1.75	1.36	6.62	3.08
16.2	3.33	2.73	1.10	2.13
17	‡	‡	0.18‡	0.24‡
17.2	0.63‡	‡	‡	0.47‡
18	‡	‡	0.18‡	‡

表 5-5 AmpF $\ell$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
18.2	†	†	0.18 <sup>†</sup>	†
p 值	0.32	0.09	0.0091 <sup>#</sup>	0.37
D21S11				
24	†	†	†	†
24.2	†	†	†	0.24 <sup>†</sup>
25	†	†	†	†
26	0.32 <sup>†</sup>	†	0.55 <sup>†</sup>	0.47 <sup>†</sup>
27	3.81	0.45 <sup>†</sup>	2.94	2.61
28	24.29	4.55	15.81	11.14
28.2	†	0.68 <sup>†</sup>	†	0.24 <sup>†</sup>
29	16.19	26.59	24.26	17.77
29.2	†	0.23 <sup>†</sup>	†	0.24 <sup>†</sup>
29.3	0.16 <sup>†</sup>	†	0.18 <sup>†</sup>	†
30	19.37	29.32	23.53	30.33
30.2	2.06	1.14	3.68	1.42
30.3	†	0.68 <sup>†</sup>	†	†
31	9.84	9.77	5.51	5.92
31.2	6.19	7.73	9.19	10.43
32	2.06	3.41	1.65	0.71 <sup>†</sup>
32.2	6.98	9.77	9.56	13.51
33	0.79	1.36	0.18 <sup>†</sup>	0.24 <sup>†</sup>
33.1	0.16 <sup>†</sup>	†	†	†



表 5-5 AmpF $\phi$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
33.2	3.81	2.73	2.39	3.55
34	0.32 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
34.1	‡	0.23 <sup>‡</sup>	‡	‡
34.2	0.16 <sup>‡</sup>	0.91 <sup>‡</sup>	0.37 <sup>‡</sup>	0.71 <sup>‡</sup>
35	2.54	‡	‡	0.47 <sup>‡</sup>
35.2	‡	‡	‡	‡
36	0.79	‡	0.18 <sup>‡</sup>	‡
37	‡	‡	‡	‡
38	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
<i>p</i> 值	0.20	0.16	0.13	0.41
D2S1338				
<14	0.16 <sup>‡</sup>	‡	0.18 <sup>‡</sup>	‡
15	0.63 <sup>‡</sup>	‡	0.18 <sup>‡</sup>	‡
16	4.6	1.82	4.60	3.08
17	10.16	8.86	18.75	19.43
18	4.76	10.68	8.27	6.87
19	16.98	19.09	13.97	16.35
20	11.9	12.05	15.26	13.74
21	14.29	3.18	2.39	1.90
22	11.75	5.68	2.76	6.64
23	7.46	16.14	9.01	14.93
24	8.1	15.23	12.13	8.53

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
25	6.19	5.91	10.66	6.64
26	2.54	0.91 <sup>†</sup>	1.65	1.66
27	0.48 <sup>†</sup>	†	0.37 <sup>†</sup>	0.24 <sup>†</sup>
28	†	†	†	†
$\rho$ 值	0.37	0.33	0.37	0.42
D3S1358				
9	0.48 <sup>†</sup>	†	†	0.24 <sup>†</sup>
11	0.16 <sup>†</sup>	†	0.18 <sup>†</sup>	†
12	0.16 <sup>†</sup>	0.23 <sup>†</sup>	†	0.24 <sup>†</sup>
13	0.95	†	†	0.47 <sup>†</sup>
14	9.05	4.32	15.99	10.43
15	31.43	34.77	25.37	35.78
15.2	0.16 <sup>†</sup>	†	†	†
16	27.62	31.82	25.92	26.07
17	22.54	20.91	17.46	16.35
18	6.98	7.05	13.42	9.95
19	0.48 <sup>†</sup>	0.23 <sup>†</sup>	1.47	0.47 <sup>†</sup>
20	†	0.23 <sup>†</sup>	0.18 <sup>†</sup>	†
$\rho$ 值	0.08	0.0064 <sup>#</sup>	0.27	0.42
D5S818				
7	0.32 <sup>†</sup>	3.41	0.18 <sup>†</sup>	4.98
8	4.92	†	0.74 <sup>†</sup>	0.47 <sup>†</sup>

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
9	1.27	7.05	4.78	3.08
10	7.46	20.23	4.96	4.27
11	25.08	30.91	36.40	38.15
12	34.76	22.95	33.82	31.75
13	23.97	14.09	17.83	16.35
14	1.43	0.68 <sup>‡</sup>	0.92	0.71 <sup>‡</sup>
15	0.79	0.23 <sup>‡</sup>	0.37 <sup>‡</sup>	0.24 <sup>‡</sup>
16	‡	‡	‡	‡
<i>p</i> 值	0.16	0.39	0.37	0.15
D6S1043				
<8	‡	‡	0.18 <sup>‡</sup>	‡
9	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
10	1.59	2.73	1.65	1.90
11	10.48	11.36	26.47	16.35
12	22.54	13.86	27.94	20.38
13	9.68	11.14	6.80	12.32
14	5.71	16.36	4.96	12.56
15	5.56	1.82	1.10	2.61
16	3.65	0.23 <sup>‡</sup>	0.92	0.24 <sup>‡</sup>
17	7.62	2.27	6.43	6.40
18	11.75	19.55	7.90	9.00
18.2	‡	0.23 <sup>‡</sup>	‡	‡

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
19	13.65	13.18	9.74	7.58
19.3	0.16 <sup>†</sup>	†	†	†
20	5.71	5.45	5.15	2.37
20.3	†	†	†	1.42
21	0.32 <sup>†</sup>	1.36	0.55 <sup>†</sup>	0.47 <sup>†</sup>
21.3	0.32 <sup>†</sup>	†	0.18 <sup>†</sup>	4.74
22	†	†	†	†
22.3	0.16 <sup>†</sup>	†	†	0.71 <sup>†</sup>
23	0.48 <sup>†</sup>	†	†	0.24 <sup>†</sup>
23.3	†	†	†	0.47 <sup>†</sup>
24	0.16 <sup>†</sup>	†	†	†
24.3	†	†	†	0.24 <sup>†</sup>
25	0.32 <sup>†</sup>	†	†	†
<i>p</i> 值	0.0416 <sup>#</sup>	0.22	0.33	0.06
D7S820				
6	0.16 <sup>†</sup>	†	†	†
7	0.79	0.23 <sup>†</sup>	1.29	1.42
8	19.05	13.64	18.01	13.27
9	10.63	5.45	14.34	8.77
10	32.38	18.41	28.12	27.96
10.2	†	0.23 <sup>†</sup>	†	†
11	21.90	36.14	21.51	23.46

表 5-5 AmpF $\ell$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
11.3	‡	‡	‡	0.24‡
12	12.70	22.73	13.24	19.19
13	2.06	1.82	2.76	4.74
14	0.32‡	0.68‡	0.55‡	0.95‡
15	‡	0.23‡	0.18‡	‡
$\rho$ 值	0.53	0.23	0.18	0.37
D8S1179				
8	0.16‡	‡	1.65	0.95‡
9	0.48‡	0.23‡	1.65	0.47‡
10	1.90	11.82	8.09	8.06
11	3.81	11.14	7.72	6.64
12	11.27	12.5	15.62	7.82
13	19.52	20.68	31.99	29.62
14	34.13	17.73	19.30	28.67
15	20.79	14.55	10.66	13.74
16	6.98	8.86	3.12	3.55
17	0.95	1.82	0.18‡	0.47‡
18	‡	0.23‡	‡	‡
19	‡	‡	‡	‡
$\rho$ 值	0.41	0.27	0.35	0.11
FGA				
17	0.32‡	0.45‡	‡	‡

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
17.2	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
18	0.79	2.27	1.47	0.24 <sup>‡</sup>
18.2	1.59	‡	‡	‡
19	6.67	6.36	5.88	6.64
19.2	0.79	‡	‡	‡
20	6.03	7.27	14.71	9.95
20.2	0.63 <sup>‡</sup>	‡	0.37 <sup>‡</sup>	0.24 <sup>‡</sup>
21	10.63	11.82	19.85	15.17
21.2	‡	0.68 <sup>‡</sup>	0.18 <sup>‡</sup>	‡
22	19.52	17.05	17.83	12.09
22.2	0.16 <sup>‡</sup>	1.14	0.55 <sup>‡</sup>	0.47 <sup>‡</sup>
23	17.30	23.41	15.07	14.22
23.2	‡	0.91 <sup>‡</sup>	0.18 <sup>‡</sup>	‡
24	16.98	17.05	15.26	17.06
24.2	‡	0.68 <sup>‡</sup>	‡	‡
25	9.05	7.05	6.80	14.45
25.2	‡	0.23 <sup>‡</sup>	‡	‡
26	4.29	1.82	1.10	5.69
26.2	‡	0.45 <sup>‡</sup>	‡	‡
27	2.86	0.68 <sup>‡</sup>	0.55 <sup>‡</sup>	2.84
28	0.95	0.23 <sup>‡</sup>	0.18 <sup>‡</sup>	0.71 <sup>‡</sup>
29	0.32 <sup>‡</sup>	‡	‡	0.24 <sup>‡</sup>

表 5-5 AmpF $\phi$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
30	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
30.2	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
31.2	0.32 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
32.2	‡	‡	‡	‡
33.2	‡	‡	‡	‡
34.2	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
42.2	‡	‡	‡	‡
43.2	‡	‡	‡	‡
44.2	‡	‡	‡	‡
45.2	‡	‡	‡	‡
46.2	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
47.2	‡	‡	‡	‡
48.2	‡	‡	‡	‡
50.2	‡	‡	‡	‡
51.2	‡	‡	‡	‡
$\rho$ 值	0.26	0.38	0.31	0.24
vWA				
11	0.48 <sup>‡</sup>	‡	‡	0.24 <sup>‡</sup>
12	0.32	‡	‡	0.24 <sup>‡</sup>
13	1.27	‡	0.37 <sup>‡</sup>	‡
14	7.14	24.09	8.27	6.87
15	20.48	2.73	12.87	13.74

表 5-5 AmpF $\mathcal{L}$ STR Sinofiler 试剂盒等位基因频率 (续)

等位基因	非洲裔美国人 (n = 315)	亚洲裔 (n = 219)	高加索裔 (n = 272)	西班牙裔 (n = 211)
16	23.97	17.27	20.04	27.73
17	20.32	23.64	25.92	27.73
18	15.87	19.77	20.04	16.11
19	6.83	10.68	10.11	6.16
20	2.70	1.36	2.39	1.18
21	0.48 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
22	‡	‡	‡	‡
23	0.16 <sup>‡</sup>	‡	‡	‡
24	‡	‡	‡	‡
$\rho$ 值	0.16 <sup>#</sup>	0.44	0.54	0.11

‡ 国家研究委员会推荐一个在法医计算中使用的最低等位基因频率（非洲裔美国人数据库为 0.79%、亚洲裔美国人数据库为 1.14%、美国高加索人数据库为 0.92%、西班牙裔美国人数据库为 1.18%）。

# HWE 精确测试的  $\rho$  值 <0.05

#### 低频率等位基因

Sinofiler 试剂盒位点的某些等位基因频率较低。对于这些等位基因来说最低频率（五被  $2n$  相除，其中的  $n$  等于数据库中的人数）被用于 Sinofiler 试剂盒非洲裔美国人、亚洲裔美国人、美国高加索人和西班牙裔数据库，正如 DNA 法医科学委员会在 1996 年报告国家研究委员会 1996 中建议的一样。这些数据库的总结见第 5-56 页表 5-6。每个位点的最低可报告基因型频率为：非洲裔美国人数据库为  $1.42 \times 10^{-4}$ ；亚洲裔美国人数据库为  $2.43 \times 10^{-4}$ ；美国高加索人数据库为  $1.76 \times 10^{-4}$ ；西班牙裔美国人数据库为  $2.57 \times 10^{-4} [p^2 + p(1-p)\bar{\theta}]$ ，其中  $\bar{\theta} = 0.01$ 。因此，在 15 个位点的最低联合多位点基因型频率为：非洲裔美国人数据库为  $1.87 \times 10^{-58}$ ；亚洲裔美国人数据库为  $6.15 \times 10^{-55}$ ；美国高加索人数据库为  $4.63 \times 10^{-57}$ ；西班牙裔美国人数据库为  $1.45 \times 10^{-54}$ 。



**一致性研究** Applied Biosystems 通过比较 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 和 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> 试剂盒之间的等位基因识别，分析了 300 个样本。用 Identifiler 和 Sinofiler 试剂盒分析这些样本获得的基因型数据表明，两者结果相一致。

## 突变率

可以通过比较子女与其父母之间的基因型估计基因位点上自发或诱发型性细胞突变。通过这种比较，可以直接计算观察到突变数量。

在既往的研究中，英格兰伯明翰的法医科学中心在总共 146 次父母子女等位基因传递（减数分裂）中，确定了十个用 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> SGM Plus<sup>®</sup> PCR 扩增试剂盒扩增的 STR 位点基因型。在 D18S11 位点观察到一个长度性 STR 突变，在其它九个 STR 位点上未见到突变。D18S11 突变的表现是增加一个 4-nt 重复单位，等位基因 17 被作为等位基因 18 遗传（单步突变）。无法区分这一突变是来自母系还是父系。

### 额外突变研究

有关直接突变率计数的额外研究（Edwards *et al.*, 1991；Edwards *et al.*, 1992；Weber 和 Wong 1993；Hammond *et al.*, 1994；Brinkmann *et al.*, 1995；Chakraborty *et al.*, 1996；Chakraborty *et al.*, 1997；Brinkmann *et al.*, 1998；Momhinweg *et al.*, 1998；Szibor *et al.*, 1998）

- 某些 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒位点的较大样本
- 修订这些突变率的方法为那些因突变率不够高而无法直接测量的位点间接地推算突变和 / 或解释那些作为孟德尔误差的无法检测出的事件。

## 一致性概率

表 5-6 显示的是 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒位点独立和联合一致性概率（PI）数值。

表 5-6 AmpF $\mathcal{L}$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒 STR 位点独立和联合相同机率数值

位点	非洲裔美国人	亚洲裔	高加索人	西班牙裔
CSF1PO	0.074	0.119	0.127	0.142
D12S391	0.041	0.046	0.025	0.026
D13S317	0.145	0.069	0.077	0.059
D16S539	0.070	0.082	0.101	0.084
D18S51	0.030	0.039	0.031	0.029
D19S433	0.037	0.067	0.081	0.049
D21S11	0.040	0.07	0.052	0.049
D2S1338	0.024	0.034	0.030	0.038
D3S1358	0.099	0.145	0.073	0.093
D5S818	0.101	0.083	0.140	0.122
D6S1043	0.028	0.034	0.057	0.029
D7S820	0.084	0.092	0.071	0.075
D8S1179	0.081	0.043	0.063	0.071
FGA	0.031	0.038	0.042	0.033
vWA	0.057	0.071	0.059	0.081
联合的	$1.12 \times 10^{-19}$	$8.37 \times 10^{-19}$	$6.28 \times 10^{-19}$	$2.31 \times 10^{-19}$

$P_1$  值是指随机选择的两个人有相同的 Sinofiler 试剂盒基因型的概率 (Sensabaugh, 1982)。本章内描述的  $P_1$  值大约为  $1/8.93 \times 10^{18}$  (非洲裔美国人)、 $1/1.19 \times 10^{18}$  (亚洲裔)、 $1/1.59 \times 10^{18}$  (美国高加索人) 和  $1/4.33 \times 10^{18}$  (西班牙裔美国人)。

## 亲子排除概率

表 5-7 显示的是亲子排除概率  $P_E$  数值，这是 AmpF $\phi$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> PCR 扩增试剂盒 STR 位点独立和联合数值。

表 5-7 AmpF $\phi$ STR<sup>®</sup> Sinofiler<sup>™</sup> 试剂盒的亲子排除概率数值

位点	非洲裔美国人	亚洲裔美国人	高加索人	西班牙裔
CSF1PO	0.530	0.433	0.461	0.402
D12S391	0.696	0.649	0.767	0.682
D13S317	0.397	0.556	0.535	0.583
D16S539	0.530	0.564	0.581	0.558
D18S51	0.766	0.712	0.737	0.748
D19S433	0.678	0.676	0.461	0.655
D21S11	0.741	0.676	0.723	0.673
D2S1338	0.766	0.767	0.737	0.758
D3S1358	0.471	0.597	0.561	0.381
D5S818	0.471	0.589	0.473	0.416
D6S1043	0.690	0.694	0.665	0.682
D7S820	0.570	0.492	0.650	0.627
D8S1179	0.581	0.739	0.602	0.655
FGA	0.715	0.694	0.679	0.710
vWA	0.672	0.597	0.636	0.655
联合的	0.99999973	0.999999774	0.99999968	0.99999964

$P_E$  值是指所有母子对的平均概率，即通过 Sinofiler 试剂盒 STR 位点 DNA 分析排除某位随机指认男士是父亲的可能性 (Chakraborty *et al.*, 1996)。



## 故障排除

---

在此附录中 请按照此附录中推荐的方法排除分析过程出现的各种问题。

故障排除 ..... [A-2](#)

# 故障排除

表 A-1 故障排除

观察到的问题	可能原因	推荐的排除方法
AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> 对照 DNA 9947A 和 DNA 检测样本所有基因位点的信号模糊或无信号	体积不准或没加 AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> PCR 反应预混液, AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 引物组或 AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA 聚合酶。	重新扩增。
	AmpliTaq Gold DNA 聚合酶未激活	重新扩增确保最初反应保持在 95°C 达 11 分钟。
	等分前未彻底振荡反应母液	彻底振荡反应母液。
	AmpF $\Delta$ STR <sup>®</sup> Sinofiler <sup>™</sup> 引物组过度曝光	避光存放引物组。
	GeneAmp <sup>®</sup> PCR 系统功能故障	参阅 PCR 仪用户手册检查仪器校准状况。
	PCR 仪参数有误	查看方案中的正确 PCR 仪参数。
	扩增过程中离心管未能在 PCR 仪内安放牢固	在第一次循环后用力推反应管使之与加热块紧密接触。重新检测。
	GeneAmp PCR 系统 9600 热护盖未对准	对准 GeneAmp 9600 热护盖顺时针旋转后使白色条纹相互对齐。
	错误的 PCR 反应管	GeneAmp 9600 和 9700 需使用带盖的 Applied Biosystems MicroAmp 反应管。
	将 MicroAmp <sup>™</sup> 基座与 GeneAmp <sup>®</sup> 9600 和 9700 的托盘 / 容器组套和离心管一起使用。	将 MicroAmp 基座从托盘 / 容器组套上取下重新检测。

表 A-1 故障排除 (续)



观察到的问题	可能原因	推荐的排除方法
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> 对照 DNA 9947A 和 DNA 检测样本所有基因位点的信号模糊或无信号 (续)	PCR 产物进样不足	<p>对于 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100/3100-Avant 或 3130/3130xl 仪器运行</p> <p>PCR 产物 1.0 <math>\mu</math>L 和 9 <math>\mu</math>L Hi-Di<sup>™</sup> 甲酰胺 /GeneScan<sup>™</sup> 500 LIZ<sup>®</sup> 溶液混合。</p> <p> <b>警告</b> 化学品危险。甲酰胺会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。它可能影响生殖系统并会诱发先天性缺陷。请认真阅读化学品安全信息表并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p>
	甲酰胺降解	<p>检查甲酰胺的存放情况切勿多次融化和重新冷冻。试用 Hi-Di<sup>™</sup> 甲酰胺。</p> <p> <b>警告</b> 化学品危险。甲酰胺会刺激眼睛、皮肤和呼吸道。它可能影响生殖系统并会诱发先天性缺陷。请认真阅读化学品安全信息表并遵照拿放指导。佩戴合适的保护眼镜、防护服和手套。</p>
AmpF $\ell$ STR <sup>®</sup> 对照 DNA 9947A 有阳性信号但 DNA 检测样本只有部分信号或没有信号。	所检测 DNA 样本量低于检测敏感度	定量 DNA, 添加 0.5 至 1.25 ng DNA。重新检测。
	检测样本内含 PCR 抑制剂, 例如血红素类复合物和某些染料	定量 DNA, 添加所需最低容量。重新检测
		在 Centricon <sup>®</sup> -100 中冲洗样本重新检测。
	检测样本 DNA 被严重降解。	如果可能, 在琼胶上运行以评价 DNA 样本的质量。如果 DNA 已被降解, 增加 DNA 量后重新扩增。
在水中或缓冲剂 (浓度不对的 EDTA) 中稀释 DNA。	用 TE 缓冲剂含 0.1 mM EDTA 重新稀释 DNA。	

表 A-1 故障排除 (续)

观察到的问题	可能原因	推荐的排除方法
在一个位点上出现一个以上的等位基因。	外源性 DNA 污染	采用适宜的方法以避免在实验室操作中混入外来 DNA。
	反应中 DNA 过多	使用推荐的模板 DNA 量 0.5 至 1.25 ng。
	混合的样本	请参阅第 5-17 页“ <a href="#">“滑移产物”</a> ”
	扩增滑移产品 (n-4 nt 位置)	
	不完整的 3' A 碱基加入 n-1 nt 位置	请参阅第 5-23 页“ <a href="#">“添加 3' A 腺苷酸”</a> ”。确保 PCR 中包括 60 °C, 60 分钟的最终延伸步骤。
	信号超过仪器的动态范围超高数据	定量 DNA 重新扩增样本添加 0.5 至 1.25 ng DNA。
	荧光色相分离不佳	
确保已安装了滤镜组 G5 模块并用于分析过程。		
电泳图谱上可见部分但不是全部基因位点。	检测样本 DNA 被严重降解。	如果可能, 在琼胶上电泳以评价 DNA 样本的质量。如果 DNA 已被降解增加 DNA 数量后重新扩增。
	检测样本内含高浓度 PCR 抑制剂例如血红素类复合物和某些荧光标记。	定量 DNA 然后添加所需要的最低容积。重新检测。
		在 Centricon-100 中冲洗样本。



# 参考文献

- Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., and Kimura, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39:362–372.
- Bonferroni, C.E. 1936. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita. *Publicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8:3–62.
- Barber, M.D. and Parkin, B.H. 1996. Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179. *Intl. J. Legal Med.* 109:62–65.
- Baron, H., Fung, S., Aydin, A., Bahrig, S., Luft, F.C., Schuster, H. 1996. Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat. Biotechnol.* 14:1279–1282.
- Begovich A.B., McClure G.R., Suraj V.C., Helmuth R.C., Fildes N., Bugawan T.L., Erlich H.A., Klitz W. 1992. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J. Immunol.* 148:249–58.
- Bender, K., Farfan, M.J., Schneider, P.M. 2004. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. *Forensic Sci. Int.* 139:134–140.
- Brinkman, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J. and Rolf, B. 1998. Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1408–1415.
- Brinkman, B., Moller, A. and Wiegand, P. 1995. Structure of new mutations in 2 STR systems. *Intl. J. Legal Med.* 107:201–203.
- Butler, J.M. 2005. Forensic DNA Typing. Burlington, MA:Elsevier Academic Press.
- Butler, J.M., Shen, Y., McCord, B.R. 2003. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 48:1054–1064.

---

Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D., Davison, L., and Deka, R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1041–1046.

Chakraborty, R., Stivers, D., and Zhong, Y. 1996. Estimation of mutation rates from parentage exclusion data: applications to STR and VNTR loci. *Mutat. Res.* 354:41–48.

Chen, G., Xin, J., Li, Y., Wu, J., Hou, Y., Li, J., Deng, S. 1999. Polymorphisms of five short tandem repeat systems in Chinese Han population in Chengdu. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 16:77–80. Chinese.

Chen, H., Li, X.W., Lian, J.H., Song, G.Y., Cheng, X.L., He, Y., Qi, H., Liu, H., Zhang, Q.X. 2004. Genetic polymorphisms of six short tandem repeat loci in the Han population of Henan province in China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21:640–642. Chinese.

Chung, D.T., Drabek, J., Opel, K.L., Butler, J.M. and McCord, B.R. 2004. A study of the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the Miniplex primer sets. *J. Forensic Sci.* 49:733–740.

Clark J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16:9677–9686.

Coble, M.D. and Butler, J.M. 2005. Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 50:43–53.

DeFranchis, R., Cross, N.C.P., Foulkes, N.S., and Cox, T.M. 1988. A potent inhibitor of Taq DNA polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 16:10355.

DNA Advisory Board, Federal Bureau of Investigation, U.S. Department of Justice. 1998. Quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories.

Drabek, J., Chung, D.T., Butler, J.M., McCord, B.R. 2004. Concordance study between Miniplex assays and a commercial STR typing kit. *J. Forensic Sci.* 49:859–860.

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H., and Caskey, C. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49:746–756.

---

Edwards, A., Hammond, H.A., Lin, J., Caskey, C.T., and Chakraborty, R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241–253.

Frank, W., Llewellyn, B., Fish, P., *et al.* 2001. Validation of the AmpF $\Lambda$ STR<sup>®</sup> Profiler Plus<sup>™</sup> PCR Amplification Kit for use in forensic casework. *J. Forensic Sci.* 46:642–646.

Glock, B., Dauber, E.M., Schwartz, D.W., Mayr W.R. 1997. Additional variability at the D12S391 STR locus in an Austrian population sample: sequencing data and allele distribution. *Forensic Sci. Int.* 90:197–203.

Grossman, P.D., Bloch, W., Brinson, E., Chang, C.C., Eggerding, F.A., Fung, S., Iovannisci, D.M., Woo, S., Winn-Deen, E.S. 1994. High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res.* 22:4527–4534.

Grubwieser, P. Muhlmann, R., Berger, B., Niederstatter, H., Palvic, M., Parson, W. 2006. A new “mini-STR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *Int. J. Legal Med.* 120:115–120.

Guo S.W., and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.

Hammond, H., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C., and Chakraborty, R. 1994. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J. Hum. Genet.* 55:175–189.

Holt, C., Stauffer, C., Wallin, J., *et al.* 2000. Practical applications of genotypic surveys for forensic STR testing. *Forensic Sci. Int.* 112:91–109.

Hu, Y., Liao, M., Zhou, B., Jia, Y., Zhang, L., Chen, G.D. 2004. Polymorphisms of five short tandem repeat systems in Chinese Zang population in Kangba area. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35:21–24. Chinese.

Junge, A., and Madea, B. 1998. Validation studies and characterization of variant alleles at the short tandem repeat locus D12S391. *Int. J. Legal Med.* 112:67–69.

Kalinowski, S.T. 2006. HW-QuickCheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Molecular Ecology Notes* 6:974–979.

---

Kimpton, C., Walton, A., and Gill, P. 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum. Mol. Genet.* 1:287.

Klintschar, M., Ricci, U., al Hammadi, N., Reichenpfader, B., Ebner, A., Uzielli, M.L. 1998. Genetic variation at the STR loci D12S391 and CSF1PO in four populations from Austria, Italy, Egypt and Yemen. *Forensic Sci. Int.* 97:37–45.

Kwok, S., and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Lareu, M.V., Pestoni, C., Schürenkamp, M., Rand, S., Brinkmann, B., and Carracedo, A. 1996. A highly variable STR at the D12S391 locus. *Int. J. Legal Med.* 109, 134–138.

Lazaruk, K., Walsh, P.S., Oaks, F., Gilbert, D., Rosenblum, B.B., Menchen, S., Scheibler, D., Wenz, H.M., Holt, C., Wallin, J. 1998. Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis* 19:86–93.

Li, D.X., Bi, L.F., Su, X.L. 2004. Genetic polymorphism of 6 short tandem repeat loci in Mongolian population of China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 21:407–409. Chinese.

Li, H. Schmidt, L., Wei, M-H., Hustad, T. Leman, M.I., Zbar, B. and Tory, K. 1993. Three tetranucleotide polymorphisms for loci:D3S1352; D3S1358; D3S1359. *Hum. Mol. Genet.* 2:1327.

Liu, S., Bi, L., Su, X. 2005. Study of genetic polymorphism of 6 short tandem repeat loci in Nongqu Mongolian of inner Mongolia Autonomous Region in China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 22:222–223. Chinese.

Lu, P., Zhao, Q.G., Liu, Y.L., Yu, Y.L., Zhu, A.P., Li, Q., Di, S.L., Feng, J.Z., Zhang, J.G., Li, C.J. 2003. Genetic polymorphism of six short tandem repeat loci in the Han population in Hebei province of China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 20:259–261. Chinese.

Magnuson, V.L., Ally, D.S., Nylund, S.J., Karanjawala, Z.E., Rayman, J.B., Knapp, J.I., Lowe, A.L., Ghosh, S., Collins, F.S. 1996. Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *Biotechniques* 21:700–709.

---

Mansfield, E.S., Robertson, J.M., Vainer, M., Isenberg, A.R., Frazier, R.R., Ferguson, K., Chow, S., Harris, D.W., Barker, D.L., Gill, P.D., Budowle, B., McCord, B.R. 1998. Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 19:101–107.

Mills, K.A., Even, D., and Murrau, J.C. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum. Mol. Genet.* 1:779.

Momhinweg, E., Luckenbach, C., Fimmers, R., and Ritter, H. 1998. D3S1358: sequence analysis and gene frequency in a German population. *Forensic Sci. Int.* 95:173–178.

Moretti, T., Baumstark, A., Defenbaugh, D., Keys, K., Smerick, J., and Budowle, B. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J. Forensic Sci.* 46(3):647–660.

Mulero, J.J., Chang, C.W., and Hennessy, L.K. 2006. Characterization of N+3 stutter product in the trinucleotide repeat locus DYS392. *J. Forensic Sci.* 51:826–830.

Nakahori, Y., Takenaka, O., and Nakagome, Y. 1991. A human X-Y homologous region encodes amelogenin. *Genomics* 9:264–269.

Revised Validation Guidelines-Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). *Forensic Science Communications* (July 2004) Volume 6 (3). Available at [www.fbi.gov/hq/lab/fsc/current/standards/2004\\_03\\_standards02.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/current/standards/2004_03_standards02.htm)

Kong, X., Murphy, K., Raj, T., He, C., White, P.S., Matise, T.C. 2004. A combined linkage-physical map of the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* 75:1143–1148.

Lareu, M.V., Pestoni, M.C., Barros, F., Salas, A., Carracedo, A. 1996. Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D12S391 locus. *Gene* 182:151–153.

Sensabaugh, G.F. 1982. Biochemical markers of individuality. In: Saferstein, R., ed. *Forensic Science Handbook*. Prentice-Hall, Inc., New York, pp. 338–415.

Sharma, V., and Litt, M. 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol. Genet.* 1:67.

---

Shin, C.H., Jang, P., Hong, K.M., Paik, M.K. 2004. Allele frequencies of 10 STR loci in Koreans. *Forensic Sci. Int.* 140:133–135.

Smith, R.N. 1995. Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *Biotechniques* 18:122–128.

Sparkes, R., Kimpton, C., Watson, S., Oldroyd, N., Clayton, T., Barnett, L., Arnold, J., Thompson, C., Hale, R., Chapman, J., Urquhart, A., and Gill, P. 1996a. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int. J. Legal Med.* 109:186–194.

Sparkes, R., Kimpton, C., Gilbard, S., Carne, P., Andersen, J., Oldroyd, N., Thomas, D., Urquhart, A., and Gill, P. 1996b. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artifacts, casework studies and success rates. *Int. J. Legal Med.* 109:195–204.

Straub, R.E., Speer, M.C., Luo, Y., Rojas, K., Overhauser, J., Ott, J., and Gilliam, T.C. 1993. A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18. *Genomics* 15:48–56.

Szibor, R., Lautsch, S., Plate, I., Bender, K., and Krause, D. 1998. Population genetic data of the STR HumD3S1358 in two regions of Germany. *Int. J. Legal Med.* 111:160–161.

Su, X., Li, D., Lifu, S.L., Yun, P.W., Yun, S. 2004. Population studies on two native Mongolian population groups in China using STR loci. *Forensic Sci. Int.* 141:197–199.

Waiyawuth, W., Zhang, L., Rittner, C., Schneider, P.M. 1998. Genetic analysis of the short tandem repeat system D12S391 in the German and three Asian populations. *Forensic Sci. Int.* 94:25–31.

Wallin, J.M., Buoncristiani, M.R., Lazaruk, K.D., Fildes, N., Holt, C.L., Walsh, P.S. 1998. SWGDAM validation of the AmpFISTR blue PCR amplification kit for forensic casework analysis. *J. Forensic Sci.* 43:854–870.

Wallin, J.M., Holt, C.L., Lazaruk, K.D., Nguyen, T.H., Walsh, P.S. 2002. Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. *J. Forensic Sci.* 47:52–65.

Walsh, P.S., Fildes, N.J., Reynolds, R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24:2807–2812.

---

Weber, J. and Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2:1123–1128.

Wiegand, P. and Kleiber, M. 2001. Less is more—length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int. J. Legal Med.* 114:285–287.

Wu, S.Z., Zhang, H.Q., Bi, Y.T. 2004. Polymorphism of STR loci D12S391/D18S865 in Wenzhou Han population. *Fa Yi Xue Za Zhi* 20:85–7. Chinese.

Yu, L., Wu, X.Y., Cai, G.Q., Ou, J.H., Cao, L.M. 2003. Sequence variation of D12S391 and D11S554 loci in Guangzhou han population. *Yi Chuan Xue Bao* 30:781–4. Chinese.





# 索引

## 符号

- +A 腺苷酸添加
  - 缺乏, 原因 5-24
  - 效率 5-23
  - 已定义的 5-23

## 数字

- 3100 和 3130 系列等位基因分型标准参照要求 3-2
- 310 等位基因分型标准参照要求 3-2

## 字母

- AmpFISTR\_Panels\_v3 4-6
- Applied Biosystems
  - 技术支持 xii
  - Applied Biosystems 联络 xii
- Applied Biosystems (美国应用生物系统公司)
  - 信息开发部 xii
- Bin 视图, 显示一个位点 4-8
- Bin 组
  - 查看 4-8
  - 导入 4-6
- CEPH 5-26
- DNA
  - 定量, 重要性 5-30
  - 定量方法 2-4
  - 混合物研究 5-35
  - 混合物研究图 5-37
  - 降解的 5-32
  - 灵敏度 5-30
  - 数量的影响, 图 5-31
  - 数量对结果的影响 5-30
  - 稳定性 5-32

- 准备待测样本 2-7
- 准备阳性对照样本 2-7
- 准备阴性对照样本 2-7
- DNA 定量, 方法 2-4
- DNA 混合物
  - 检测的局限性 5-38
  - 扩增图 5-38
- FTA 卡
  - DNA 扩增 2-9
  - 图显示结果 2-9
- GeneMapper ID 软件
  - 查看导入的标准片段组 4-7
  - 等位基因标签 4-12
  - 分析和编辑样本文件 4-17
  - 分析设置 4-17
  - 峰检测器标签 4-13
  - 峰质标签 4-14
  - 考虑因素 4-2
  - 片段标准 4-17
  - 一般标签 4-11
  - 质量旗标标签 4-15
- GeneMapper Manager (管理器) 4-9, 4-16
- GeneScan 标准片段
  - 关于 1-10
- GeneScan 片段标准
  - 每次反应的容积 3-4, 3-7
  - 片段大小 4-17
  - 荧光标记标签 1-7
- HID 分析方法导入 4-9
- Hi-Di 甲酰胺每次反应的容积 3-4, 3-7
- Import Panels (导入标准片段组) 对话框。 4-5
- LIZ 标准片段
  - 关于 1-10
- LIZ 片段标准
  - 每次反应的容积 3-4, 3-7
- MSDS
  - 描述 vii
  - 索取 vii

Panel Manager (标准片段组管理器) 4-4

PCR

设置 2-2

实施 2-8

PCR 工作区 2-2

PCR 扩增仪

用于试剂盒 2-2

PCR 仪

编制 2-8

PCR 抑制剂

血红素 5-33

PCR 最终反应体积 2-7

PQV 标签 4-15

Quantifiler 试剂盒, 描述 2-5

STRBase 5-41

## A

安全

化学品废料 viii

生物危险 x

指南 viii, ix

## B

标准片段组查看 4-7

## C

材料, 未包括在试剂盒内的 1-10

材料和设备 1-9

菜单命令, 体例描述 v

操作系统 1-7, 3-3, 3-6

产品开发验证 5-2

粗体文字, 何时使用 v

## D

等位基因

低频率 5-54

非标准 5-4

峰高比, 表 5-35

等位基因 bin

定义 4-2

偏移范围 4-2

等位基因分型标准参照

分析方法 4-2

精确度结果表 5-6

每次反应的容积 3-4, 3-7

图 1-5

推荐的每次电泳数量 3-2

样本类型 4-2

准确进行基因分型的要求 3-2

低 TE 缓冲液, 配制 2-3

电泳

参考文献 3-3, 3-6

电泳模式 3-3, 3-6

设置 3-3, 3-6

数据采集软件 3-3, 3-6

准备样本 3-4, 3-7

电泳模式 3-3, 3-6

电泳图

额外峰 5-17

额外峰的原因 5-17

物种特异性 5-28

对照 DNA

关于 1-10

对照 DNA, 关于 1-10

多组分分析 1-7

## E

额外峰, 原因 5-17

## F

发射光谱 1-8

反应为 PCR 准备 2-6

放射性废料, 拿放 ix

非标准等位基因 4-3, 5-4

废料处理, 指南 ix

分裂峰

+A 腺苷酸添加 5-23

图 5-24

分析方法, 等位基因分型标准参照 4-2

分析方法设置 4-11

峰高, 最低 4-13  
峰高比, 等位基因表 5-35

## G

工作区  
PCR 设置 2-2  
扩增的 DNA 2-2  
故障排除原因和排除方法 A-2

## H

滑移产物 5-17  
滑移峰百分比  
超高峰 5-17  
位点的最高数值 5-17  
相对于等位基因长度 5-17  
滑移峰比值  
D19S433、vWA、D12S391 和 D18S51  
位点 5-20  
D3S1358、D5S818、D13S317、D16S539  
和 D2S1338 位点 5-19  
D5S818 和 FGA 5-21  
D8S1179、D2S1338、D7S820 和  
CSF1PO 位点 5-18  
化学品安全安全指南 vii  
化学品废料 viii  
化学品废料安全安全指南 ix  
混合物研究 5-35  
混合样本, 基因分型确定方法 5-37

## J

基线噪音, 范例 5-25  
技术支持, 联络 xii  
精确度, 测定片段大小 5-4  
精确度和片段大小窗口 5-4  
警告, 描述 vi

## K

客户对文件的反馈 xii

## L

流程图概述 1-6  
浏览窗口  
Panel Manager (标准片段组管  
理器) 4-5  
显示标准片段组清单 4-7

## P

培训, 信息 xii  
片段标准 GeneMapper ID 软件 4-17  
片段大小测定精确度 5-4

## Q

切记, 描述 vi

## S

设备, 未包括在试剂盒内的 1-10  
生物危险性废料, 拿放 ix  
实验和结果 5-1  
试剂  
低 TE 缓冲液 2-3  
未包括在试剂盒内的 1-10  
试剂盒  
反应母液 1-9  
扩增的位点 1-3  
描述 1-2  
目的 1-2  
内容物 1-9  
使用的 PCR 扩增仪于 2-2  
适用的仪器 1-2  
试剂 1-9  
引物 1-2, 1-9  
荧光标记 1-7  
试剂盒内容物 1-9  
试剂盒性能, 比较  
DNase I 图 5-33  
血红素, 图 5-34  
数据, 不同人群 5-40  
数据, 杂峰 5-25  
数据采集软件 1-7

数据的准确度、精确度和可重现性 5-3  
数据中的杂峰 5-25

## T

突变, STR 5-55  
突变率 5-55  
突变研究 5-55

## W

危险, 化学品废料 viii  
危险, 描述 vi  
位点  
    定位 5-27  
    扩增的 1-3  
    联合基因型频率 5-54  
    群体中的基因型频率 5-54  
    染色体位置 1-3  
    特征描述 5-26  
    荧光标记标签 1-3  
位点, 显示 Bin 视图 4-8  
位点特征描述, 验证 5-26  
文件, 相关的 xi  
文字体例  
    粗体文字 v  
    描述菜单命令 v  
    切记! v  
    斜体文字 v  
    用户警示文字 v  
    注释 v

稳定性, DNA 5-32  
五种荧光标记分析 1-3 至 1-4  
物种特异性 5-28

## X

项目分析设置 4-17  
斜体文字, 何时使用 v  
信息开发部, 联络, 客户反馈, 有关  
    Applied Biosystems 文件 xii  
血斑 FTA 卡, 扩增 2-9  
血红素, 影响 5-33

## Y

### 验证

DNA 定量的重要性 5-30  
DNA 数量的影响 5-30  
混合物研究 5-35  
开发的 5-2  
灵敏度 5-30  
亲子排除概率 5-57  
群体数据 5-40  
突变率 5-55  
位点特征描述 5-26  
稳定性 5-32  
物种特异性 5-28  
样本和分型标准参照等位基因 5-4  
要评价的实验 5-2  
一致性概率 5-56  
重要性 5-2

样本标准 1-10  
样本等位基因 5-4  
一致性概率  
    定义 5-56  
    群体 5-56  
    数值 5-56

一致性研究 5-55

遗传 5-26

### 引物

    关于 1-2  
荧光标记 1-7  
用户警示文字, 描述 v

## Z

### 指南

    化学品废料处理 viii  
质量旗标设置 4-15  
注意, 描述 vi  
准确度 and 可重现性 5-3



### **Worldwide Sales and Support**

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

### **Headquarters**

850 Lincoln Centre Drive  
Foster City, CA 94404 USA  
Phone: +1 650.638.5800  
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224  
Fax: +1 650.638.5884

2011 04 25