技术手册

MSI Analysis System, Version 1.2

MSI 分析系统, 1.2 版本

MD1641 产品使用说明



www.promega.com

修订于 12/12

编号 CTM255

MSI 分析系统，1.2 版本

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用本试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。电子邮件：chinatechserv@promega.com

1. 产品介绍 2
- 1.A. MSI 分析系统 2
- 1.B. 微卫星不稳定性（MSI ）简介 4
- 1.C. 内标（Internal Lane Standard 600， ILS 600） 4

2. 产品组分和储存条件 5

3. DNA 提取方法 5

4. 用 MSI 分析系统进行 DNA 扩增 6
- 4.A. 扩增体系的建立 6
- 4.B. 扩增循环参数的设置 7

5. 使用 ABI PRISM® 310 遗传分析仪检测扩增片段 9
- 5.A. Matrix 生成（或光谱校正） 9
- 5.B. 样品准备 10
- 5.C. 仪器准备 10

6. 用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪，用 1.0.1 或 1.1 版本的数据收集软件，检测扩增片段 11
- 6.A. 光谱校正 11
- 6.B. 样品准备 12
- 6.C. 仪器准备 12

7. 使用 ABI PRISM® 3100 或 3100-Avant 遗传分析仪，2.0 版本的数据收集软件，或使用 Applied Biosystems 3130 或 3130*xl* 遗传分析仪，检测扩增片段 14
- 7.A. 光谱校正 15
- 7.B. 样品准备 15
- 7.C. 仪器准备 16

8. 数据分析 17
- 8.A. MSI 分析概述 17
- 8.B. 将 Panels 和 Bins 文件导入 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本） 20
- 8.C. 用 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本）创建数据分析方法 20
- 8.D. 创建片段大小标准（Size Standard） 22
- 8.E. 数据处理 23
- 8.F. 复审片段大小标准（Size Standard） 23
- 8.G. 复审样本数据分析 23

9. 常见问题与解决方案 24

10. 附录 26
- 10.A. 相关产品 26
- 10.B. 单核苷酸重复基因座的等位基因频率 27

1. 产品介绍

1.A. MSI 分析系统

MSI 分析系统，1.2 版本，是以荧光多重PCR为基础来检测人类细胞中微卫星不稳定性（microsatellite instability, MSI）的方法。典型的MSI分析是将分别扩增自正常和待测样品（可能有错配修复缺陷）的DNA产生的微卫星标志物等位基因谱进行比较。若等位基因在待测样品中出现，但在相应的正常样品中不能检出，则提示存在MSI。MSI分析系统包含的荧光标记引物可以同时扩增7个标志物，其中5个是单核苷酸重复标志物 （BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24和MONO-27），2个是五核苷酸重复标志物（Penta C 和 Penta D） （见图1和表1）。单核苷酸标志物是用来测定MSI的，而五核苷酸标志物是用来检测潜在的样品混杂或污染的。将内标（internal lane size standard，见图2）加入扩增样品中以确保准确标识等位基因的大小以及调整不同次运行间的差异。PCR扩增产物可用ABI PRISM® 310、3100或Applied Biosystems® 3130、3130*xl*遗传分析仪进行毛细管电泳分离，输出的数据可以用GeneMapper®软件(Applied Biosystems)进行分析以确定待测样品的MSI状态。为了简化数据分析，我们创建了panels和bins文本文件，以便于用GeneMapper®软件可以进行基因型的自动分配。与GeneMapper®软件配合使用的panels和bins文件可以从下面的Promega网站获取：
www.promega.com/resources/tools/msi-panels-and-bins-for-genemapper-software/

注意：如想使用与本操作手册不同类型的电泳胶或毛细管，请与Promega 北京技术服务部联系，电子邮件：chinatechserv@promega.com

表 1. MSI分析系统基因座信息

Marker 名称	GenBank® 号	主要重复序列	片段大小范围（bp）[1]	K562 等位基因（bp）	引物标记染料[2]
NR-21	XM_033393	$(A)_{21}$	94–101	101	JOE
BAT-26	U41210	$(A)_{26}$	103–115	113	FL
BAT-25	L04143	$(A)_{25}$	114–124	122	JOE
NR-24	X60152	$(A)_{24}$	130–133	130	TMR
MONO-27	AC007684	$(A)_{27}$	142–154	150	JOE
Penta C	AL138752	$(AAAAG)_{3–15}$	143–194	164, 174	TMR
Penta D	AC000014	$(AAAAG)_{2–17}$	135–201	168, 187	FL

[1] 等位基因大小是用ABI PRISM® 3100遗传分析仪、POP-4™ 胶和36cm毛细管测定的。大小在表中所列范围之外的罕见等位基因可能存在。当使用不同电泳胶或不同仪器配置时，等位基因大小可能会有变化。

[2]TMR = carboxy-tetramethylrhodamine; FL = fluorescein;
JOE = 6-carboxy-4′,5′-dichloro-2′,7′-dimethoxyfluorescein

MSI分析系统中选用的单核苷酸重复标志物针对样品存在的错配修复缺陷都具有高灵敏度和特异性。这些单核苷酸重复标志物是准单态的，即对一个特定标志物的相同共有等位基因在几乎所有个体中都是纯合子（等位基因频率见第10.B部分）。使用单态标志物使数据的解释更简单。选择五核苷酸重复标志物是由于它们具有高度多态性和低度MSI，便于鉴定样品的唯一性，帮助核实待测样品和对应的正常样品是否取自同一个体。

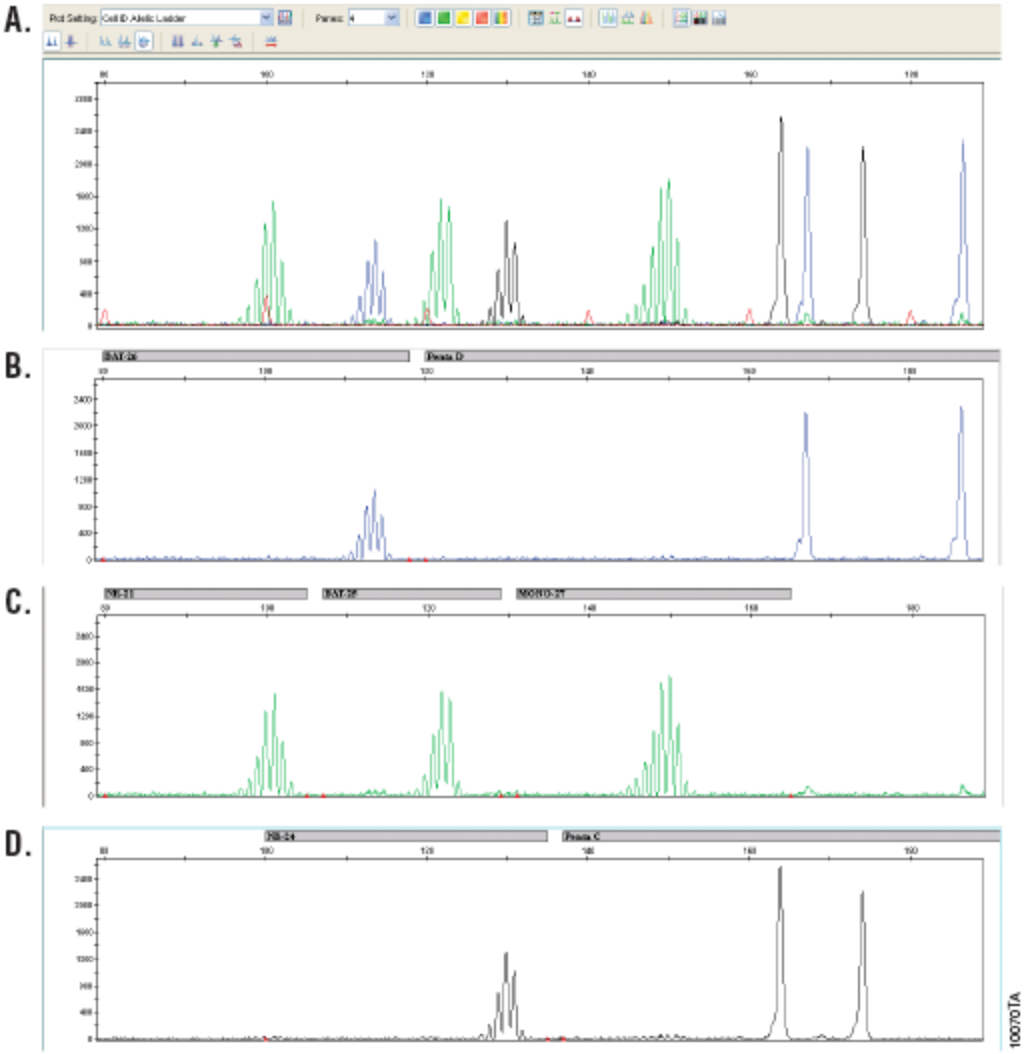


图 1. MSI分析系统，1.2版本。用MSI分析系统扩增单一的正常基因组DNA模板（1-2ng），PCR产物使用ABI PRISM® 3100遗传分析仪分析，电泳胶为POP-4™，毛细管长度为36cm。A. 5个单核苷酸基因座、2个五核苷酸基因座和内标（ILS 600）的电泳谱图。B. 使用荧光素（FL）标记基因座的电泳谱图：BAT-26和Penta D。C. 使用JOE标记基因座的电泳谱图：NR-21、BAT-25和MONO-27。D. 使用TMR标记基因座的电泳谱图：NR-24和Penta C。

1.B. 微卫星不稳定性（MSI ）简介

微卫星是短串联重复DNA序列，长度为1-6个碱基对。这些重复序列广泛存在于基因组中，并且由于在每一基因座位点串联重复次数不同，这些重复序列的长度在不同个体中经常有差异。微卫星标志物可以用于检测微卫星不稳定性（基因组不稳定性的一种）。MSI是微卫星等位基因长度的改变，这种改变是由于DNA复制过程中重复单元的插入或删除以及DNA错配修复系统纠错失败造成的。

1.C. 内标（Internal Lane Standard 600， ILS 600）

内标（ILS 600）包含22个DNA片段，长度分别为60、80、100、120、140、160、180、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550和600个碱基（见图2）。每个片段都用羧基-X-罗丹明（carboxy-X-rhodamine, CXR）标记，并在MSI分析系统扩增的材料中用ABI PRISM® 310、3100 或Applied Biosystems 3130、3130*xl* 遗传分析仪将其单独检测（作为第四色）。在每次毛细管进样中都要使用ILS 600，以便增加使用MSI分析系统时分析的精准性。在5.B、6.B和7.B部分提供了如何准备和使用内标的操作说明。

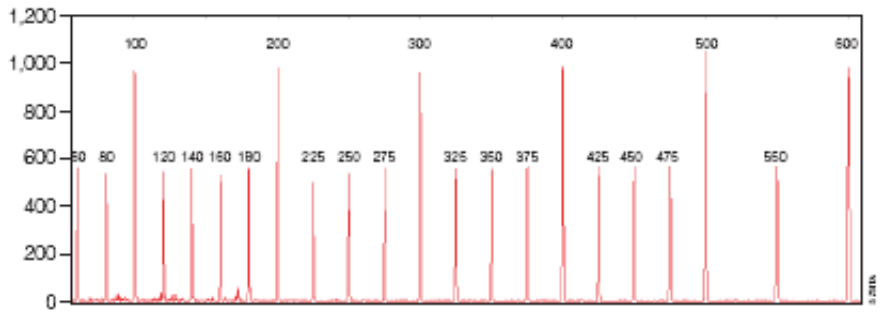


图 2. 内标（Internal Lane Standard 600）。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
MSI Analysis System, Version 1.2	100 个反应（50 个反应对）	MD1641

仅供研究使用。不能用于诊断用途。

每个试剂盒包含的试剂足够做 100 个反应（50 个反应对）。包括：

扩增前组分盒（蓝色管盖）

- 1 X 100µl MSI 10X Primer Pair Mix
- 1 X 300µl Gold ST★R 10X Buffer
- 1 X 1.25ml Nuclease-Free Water
- 1 X 3µg K562 High Molecular Weight DNA (10ng/µl)

扩增后组分盒（黄色管盖）

- 1 X 150µl Internal Lane Standard 600 （ILS 600）

储存条件：所有组分均需储存在-30℃到-10℃。MSI 10X Primer Pair Mix 和内标（ILS 600）对光敏感，必须避光保存。

可单独购买的产品

产品	规格	目录号
PowerPlex® Matrix Standards, 310	50µl（每种染料）	DG4640
PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130	25µl（每种染料）	DG4650

不能用于医疗诊断用途。

3. DNA 提取方法

从福尔马林固定石蜡包埋（formalin-fixed paraffin-embedded，FFPE）的组织中获得足够的高质量的 DNA 并非易事。组织样品在用石蜡包埋之前由于固定时间过长或固定方法不当经常已经降解。Promega 为用户提供了自动化及手动操作的基因组 DNA 提取试剂盒，可以从 FFPE 组织切片中纯化高质量的 DNA。Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit（目录号 AS1130）提供了一种简单的、自动化的操作方法，可从 1 到 10 个 5µm 的 FFPE 组织切片样品中纯化基因组 DNA，无需使用诸如二甲苯之类危险的有机溶剂。ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System（目录号 A2352）为从 FFPE 组织中纯化基因组 DNA 提供了一个灵活的、包含了所有试剂的手动操作方法，无需使用危险溶剂，也无需过夜消化。而 MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System（目录号 MD1490）为从 FFPE 组织中提取基因组 DNA 提供了一种基于 MagneSil®顺磁性颗粒技术的方法。如欲获得关于上述产品的更多信息，可以联系 Promega 北京技术服

务部（电子邮件：chinatechserv@promega.com）或当地特约经销商（联系信息可从 www.promega.com.cn 获取）。

4. 用 MSI 分析系统进行 DNA 扩增

用户需准备的材料

- 热循环仪 [GeneAmp® System 9600 或 9700 (Applied Biosystems)]
- 微量离心机
- 0.2ml 薄壁微量离心管、MicroAmp®联排反应管或 MicroAmp®透光 96 孔反应板（Applied Biosystems）
- 1.5ml 微量离心管
- 防回吸加样枪头
- AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶（Life Technologies 目录号 N8080242）

MSI 分析系统是根据下述操作方法，为在 10µl 反应体系中扩增 1-2ng 基因组 DNA 而优化的。然而，由于样品及 DNA 提取方法的不同，所得到的 DNA 产率和质量会有差异，因此各个实验室应该对 DNA 的用量进行优化。DNA 模板量过大可能会导致峰高超过毛细管电泳仪的线性检测范围。DNA 模板量不足会导致 PCR 产率低，进而使峰高低于检测极限（50RFU）。强烈建议对模板 DNA 进行准确定量。

MSI 分析系统是用 GeneAmp® System 9600 和 9700 热循环仪对扩增进行的优化。

4.A. 扩增体系的建立

注意：我们强烈建议操作中戴手套及使用防回吸枪头以防止交叉污染。建议将所有扩增前和扩增后的试剂保存在单独的房间里，在建立反应专用的房间里准备扩增反应，使用专用的设备和材料建立扩增反应。

1. 融化 Gold ST★R 10X Buffer、MSI 10X Primer Pair Mix 和 Nuclease-Free Water（无核酸酶水）。
2. 每次使用前将试剂涡旋振荡 15 秒以充分混匀。Gold ST★R 10X Buffer 中可能会有沉淀形成。如果发现沉淀，可以将 buffer 在 37℃短暂温育后涡旋振荡使之溶解。
3. 准备扩增混合液之前，先确定扩增反应的数目，其中应包括阳性和阴性对照反应。再增加 1-2 个反应数以补偿移液造成的损失。这种方法可以确保所有的样品均有足够的 PCR 反应液，并且也可以确保每个反应管中含有同样体积的反应液。
4. 将 0.2ml 微量离心管置于架上并正确标记，或者使用 MicroAmp®透光 96 孔反应板。

5. 下表中列出的每个样品需要的各组分体积是按照 10µl 反应体系，2µl DNA 模板计算的。如果使用的模板体积不是 2µl，那么水的体积要做相应调整。

MSI 分析系统扩增混合液

组分	每个反应所加体积
无核酸酶水（Nuclease-Free Water）	5.85µl
Gold ST★R 10X Buffer	1.00µl
MSI 10X Primer Pair Mix	1.00µl
AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶（5u/µl）	0.15µl
总体积	**8.00µl**

注意：移取小于 1µl 的液体时容易不准确。建议准备足量的扩增混合液以避免这种小量移液的情况。

6. 在一个无菌 1.5ml 离心管中混合无核酸酶水、Gold ST★R 10X Buffer、MSI 10X Primer Pair Mix 和 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶。轻轻混匀。

7. 将 8µl 扩增混合液加到每个反应管或孔中。

8. 向含有扩增混合液的样品管或孔底加入 2µl 模板 DNA（1-2ng），用枪头吹吸数次混匀。

在将模板 DNA 转移至含有扩增混合液的反应管或孔之前，一定要**充分混匀**。

注意：将 DNA 模板储存在无核酸酶水或 TE-^{4} 缓冲液[10mM Tris HCl (pH8.0), 0.1mM EDTA]中。如果储存模板 DNA 的 TE 缓冲液 pH 不是 8.0，或者含有的 EDTA 浓度过高，则 DNA 样品的加入体积不应超过反应终体积的 20%。PCR 扩增效率和扩增质量会受到 pH 值变化（与加入的 Tris-HCl 有关）、有效镁离子浓度（与 EDTA 的螯合作用有关）或其它 PCR 抑制物的影响，抑制物的浓度也许很低，这取决于模板 DNA 的来源及提取方法。

9. 设置扩增的阳性对照。将 K562 High Molecular Weight DNA 用无核酸酶的水稀释 10 倍至浓度为 1ng/µl。取 2ng 稀释的 DNA 加到含有扩增混合液的反应管或孔中，用枪头吹吸数次混匀。

10. 设置扩增的阴性对照。将无核酸酶的水（替代模板 DNA）加到含有扩增混合液的反应管或孔中，用枪头吹吸数次混匀。

4.B. 扩增循环参数的设置

1. 将反应管或 MicroAmp®透光 96 孔反应板置于热循环仪中。

2. 选择并运行推荐的扩增程序，下面提供了使用 GeneAmp® PCR System 9600 或 9700 热循环仪进行扩增的操作程序。

使用 GeneAmp® PCR System 9600 热循环仪的操作程序

热循环程序

95℃ for 11 minutes, then:

96℃ for 1 minute, then:

94℃ for 30 seconds
ramp 68 seconds to 58℃, hold for 30 seconds
ramp 50 seconds to 70℃, hold for 1 minute
For **10 cycles**, then:

90℃ for 30 seconds
ramp 60 seconds to 58℃, hold for 30 seconds
ramp 50 seconds to 70℃, hold for 1 minute
For 2**0 cycles**, then:

60℃ for 30 minutes

4℃ soak

使用 GeneAmp® PCR System 9700 热循环仪的操作程序

注意：GeneAmp® PCR System 9700 的热循环条件用的是 9600 emulation mode 和银热模块板。

热循环程序

95℃ for 11 minutes, then:

96℃ for 1 minute, then:

ramp 100% to 94℃ for 30 seconds
ramp 29% to 58℃ for 30 seconds
ramp 23% to 70℃ for 1 minute
For **10 cycles**, then:

ramp 100% to 90℃ for 30 seconds
ramp 29% to 58℃ for 30 seconds
ramp 23% to 70℃ for 1 minute

For 2**0 cycles**, then:

60℃ for 30 minutes

4℃ soak

3. 热循环仪程序结束后，将扩增后的样品在-20℃避光保存。

注意：DNA 的量及其质量会影响 PCR 产率。为了尽量减少问题，可以使用推荐的 DNA 纯化方法并且对 DNA 进行准确定量。可以改变循环数以调整 DNA 量的差异所引起的 PCR 产率变化，但不应超过 32 个循环。

5. 使用 ABI PRISM® 310 遗传分析仪检测扩增片段

用户需准备的材料

- 干加热块、水浴装置或热循环仪
- 310 用毛细管，47cm X 50µm（Applied Biosystems）
- 性能优化的电泳胶 4 (POP-4™) （Applied Biosystems）
- 含 EDTA 的 10X 遗传分析仪缓冲液（Applied Biosystems）
- 样品管及隔片（Applied Biosystems）
- 防回吸加样枪头
- Hi-Di™甲酰胺（Applied Biosystems，目录号 4311320）
- PowerPlex® Matrix Standards, 310（目录号 DG4640）
- 碎冰或冰水混合物

甲酰胺的质量对实验十分重要，请使用 Hi-Di™甲酰胺。甲酰胺应分装冻存于-20℃，反复冻融或长期储存于 4℃会导致甲酰胺的降解。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时可与 DNA 发生竞争，从而使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间可能不会增加信号强度。

甲酰胺为具有刺激性的致畸胎剂，应避免吸入及直接接触皮肤。请仔细阅读警告标签，当操作该试剂时需采取适当的防护措施。当使用甲酰胺时，请始终戴手套和防护眼镜。

5.A. Matrix 生成（或光谱校正）

在 ABI PRISM® 310 遗传分析仪上生成 matrix 需要使用 PowerPlex® Matrix Standards, 310（目录号 DG4640）。在 ABI PRISM® 310 遗传分析仪上，不可使用 PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130（目录号 DG4650）生成 Matrix 文件。有关 matrix 生成的操作流程和进一步信息，可以参阅 *PowerPlex® Matrix Standards, 310 的技术手册*（#TBD021），手册可以登录网站 www.promega.com/protocols/获得。

正确进行光谱校正对在 ABI PRISM® 310 遗传分析仪上评估多色系统很重要。对每一台 ABI PRISM® 310 遗传分析仪都必须进行光谱校正。有关 matrix 生成的问题，请联系 Promega 北京技术服务部，电子邮件：chinatechserv@promega.com

5.B. 样品准备

内标（ILS 600）包含在每一个毛细管电泳样本中以使扩增样品的分析标准化，内标使用第 4 种颜色。

1. 按照以下方法混合内标（ILS 600）和 Hi-Di™甲酰胺，制备上样缓冲液：
   [(1.0µl ILS 600) + (24µl Hi-Di™甲酰胺)] X（电泳样本数）
2. 将 25µl 准备好的上样缓冲液与 1µl 扩增样品混合。
   注意：不同仪器的检测底限存在差异，因此需要适当调整进样时间、进样电压或增减与上样缓冲液混合的扩增产物的量。在数据收集软件中，使用 Module Manager 中的 run module 来调整进样时间或电压（见下面的“仪器准备”部分）
3. 将样本置于 95℃变性 3 分钟，立即放在碎冰上或冰水浴中冷却 3 分钟，之后尽快在遗传分析仪上进行电泳。
4. 将样品管置于合适的自动进样托盘上。
5. 将自动进样托盘置于仪器内，关上仪器门。

5.C. 仪器准备

参照 ABI PRISM® 遗传分析仪用户手册的说明进行泵的清洗、安装毛细管矩阵、校正自动进样托盘及灌胶。

1. 打开 ABI PRISM® 310 的数据收集软件（Data Collection Software）。
2. 参照 ABI PRISM® 310 遗传分析仪用户手册的说明准备 GeneMapper®样品表。在 Sample Info 栏目输入相应的样品信息。
3. 创建一个新的 GeneMapper®电泳进样清单。在下拉菜单中选择相应的样品表。
4. 在下拉菜单中选择“GS STR POP4 (1ml) A”模式。将进样时间改为 2 秒，其余参数的设置如下：

Inj. Secs:	1-5
Inj. kV:	15.0
Run kV:	15.0
Run ℃:	60
Run Time:	30

   注意：由于不同仪器的检测灵敏度存在差异，进样时间可能需要优化。当模板 DNA 的量为 1-2ng 时，我们建议的进样时间范围是 1-5 秒。

5. 选择适当的 Matrix 文件（参见 5.A 部分）。
6. 选择“auto-analyze”及适当的分析参数和片段大小标准，可以对数据进行自动分析。参考 ABI PRISM®

遗传分析仪用户手册，以获取进一步信息。

7. 装载样品盘，关闭仪器门，点击“Run”，开始毛细管电泳。
8. 通过观察原始数据和运行状态视窗来监控电泳。 每个样本从进样到电泳完成大约需要 30 分钟。

6. 用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪，用 1.0.1 或 1.1 版本的数据收集软件，检测扩增片段

用户需准备的材料

- 干加热块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰或冰水混合物
- 防回吸加样枪头
- 3100 毛细管矩阵，36cm
- 性能优化的电泳胶 4 (POP-4™) （Applied Biosystems）
- 含 EDTA 的 10X 遗传分析仪缓冲液（Applied Biosystems）
- 用于 3100 的样品管及隔片（Applied Biosystems）
- Hi-Di™甲酰胺（Applied Biosystems，目录号 4311320）
- PowerPlex® Matrix Standards, 3100（目录号 DG4650）

甲酰胺的质量对实验十分重要，请使用 Hi-Di™甲酰胺。甲酰胺应分装冻存于-20℃，反复冻融或长期储存于 4℃会导致甲酰胺的降解。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时可与 DNA 发生竞争，从而使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间可能不会增加信号强度。

甲酰胺为具有刺激性的致畸胎剂，应避免吸入及直接接触皮肤。请仔细阅读警告标签，当操作该试剂时需采取适当的防护措施。当使用甲酰胺时，请始终戴手套和防护眼镜。

6.A. 光谱校正

在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上进行光谱校正需要使用 PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130（目录号 DG4650）。在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上使用 POP-4™胶和 36cm 毛细管时，不可使用 PowerPlex® Matrix Standards, 310（目录号 DG4640）生成 Matrix 文件。有关光谱校正的操作流程和进一步信息，可以参阅 *PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130 的技术手册*（#TBD022），手册可登录网站 www.promega.com/protocols/获得。

正确进行光谱校正对在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上（使用 POP-4™胶和 36cm 毛细管）评估多色系统至关重要。对每一台 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪（使用 POP-4™胶和 36cm 毛细管）都必须进行光谱校正。有关光谱校正的问题，请联系 Promega 北京技术服务部，电子邮件：chinatechserv@promega.com

6.B. 样品准备

内标（ILS 600）包含在每一个毛细管电泳样本中以使扩增样品的分析标准化，内标使用第 4 种颜色。

1. 按照以下方法混合内标（ILS 600）和 Hi-Di™甲酰胺，制备上样缓冲液：

   [(0.5µl ILS 600) + (9.5µl Hi-Di™甲酰胺)] X（电泳样本数）

   注意：可以通过增减上样缓冲液中内标的加入量，来调整分子量标准的峰值强度。内标中 100bp 片段的理想峰值为 500-1000 RFU。如果峰值过低，我们建议将甲酰胺/内标的比例改为：1.0µl ILS 600 加 9.0µl Hi-Di™甲酰胺。如果峰值过高，我们建议将甲酰胺/内标的比例改为：0.25µl ILS 600 加 9.75µl Hi-Di™甲酰胺。

2. 涡旋振荡 10-15 秒。
3. 往每孔中加入 10µl 甲酰胺/内标混合液。
4. 往每孔中加入 1µl 扩增样品。用隔片将孔板覆盖。

   注意：不同仪器的检测底限存在差异，因此需要适当调整进样时间、进样电压或增减与上样缓冲液混合的扩增产物的量。在数据收集软件中，使用 Module Manager 中的 run module 来调整进样时间或电压（见下面的“仪器准备”部分）。

5. 必要时短暂离心样品板，以去除孔中的气泡。
6. 将样本置于 95℃变性 3 分钟，立即放在碎冰上或冰水浴中冷却 3 分钟，之后尽快在遗传分析仪上进行电泳。

6.C. 仪器准备

参照 ABI PRISM® 3100 型遗传分析仪用户手册的说明进行泵的清洗、安装毛细管矩阵、进行空间校正及灌胶。

1. 打开 ABI PRISM® 3100 的数据收集软件（Data Collection Software）。
2. 创建一个新的平板记录。给平板命名，选择“GeneScan”，选择平板的规格（96 孔或 384 孔），点击“Finish”。

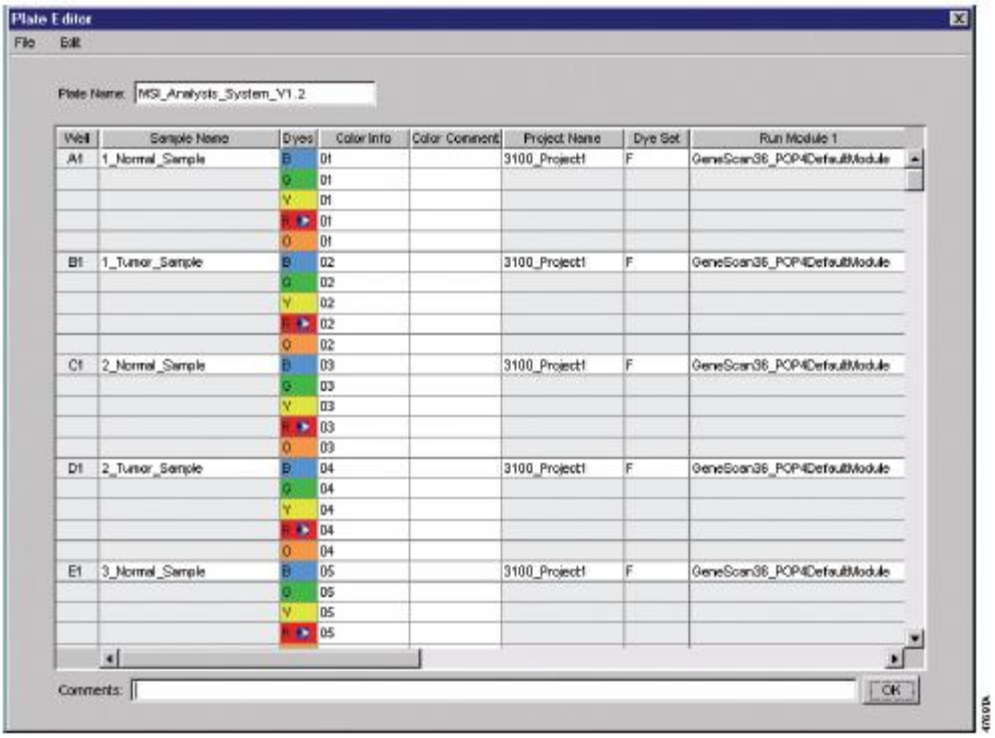


图 3. 平板编辑（Plate Editor）

3. 完成加样孔相对应的平板记录表。在 Sample Name 栏目输入相应的信息（见图 3）。
4. 在 Project Name 栏目的下拉菜单中选择“3100_Project1”。
5. 在 Dye Set 栏目的下拉菜单中选择 F。
6. 在 Run Module 1 栏目的下拉菜单中选择“GeneScan36_POP4DefaultModule”。
7. 如果收集数据时不自动分析，则在 Analysis Module 1 栏目中选择“No Selection”。完成数据收集后，使用 GeneMapper®分析软件分析数据的过程中，可以对分析参数进行适当的设置。

   如果要在数据收集过程中分析数据，则需在 Analysis Module 1 栏目中选择适当的分析模式（analysis module）。请参照 ABI PRISM® 3100 型遗传分析仪用户手册的说明创建分析模式。

8. 点击 OK。新的平板记录将会出现在收集软件样品板设置页面中的待测样品板记录表中。
9. 将样品板放入仪器中，关闭仪器门。
10. 在待测样品板记录表中，单击刚刚创建的样品板记录的名称。
11. 一旦待测样品板记录被选中，点击与含有扩增样品的平板相对应的样品板图表（plate graphic）。

12. 当样品板记录与相应的样品板关联以后，样品板图表将从黄色变成绿色，样品板记录将由待测样品板记录表中移至相关联的样品板记录表中，并且此时 Run Instrument 按键会变成可执行状态（见图 4）。

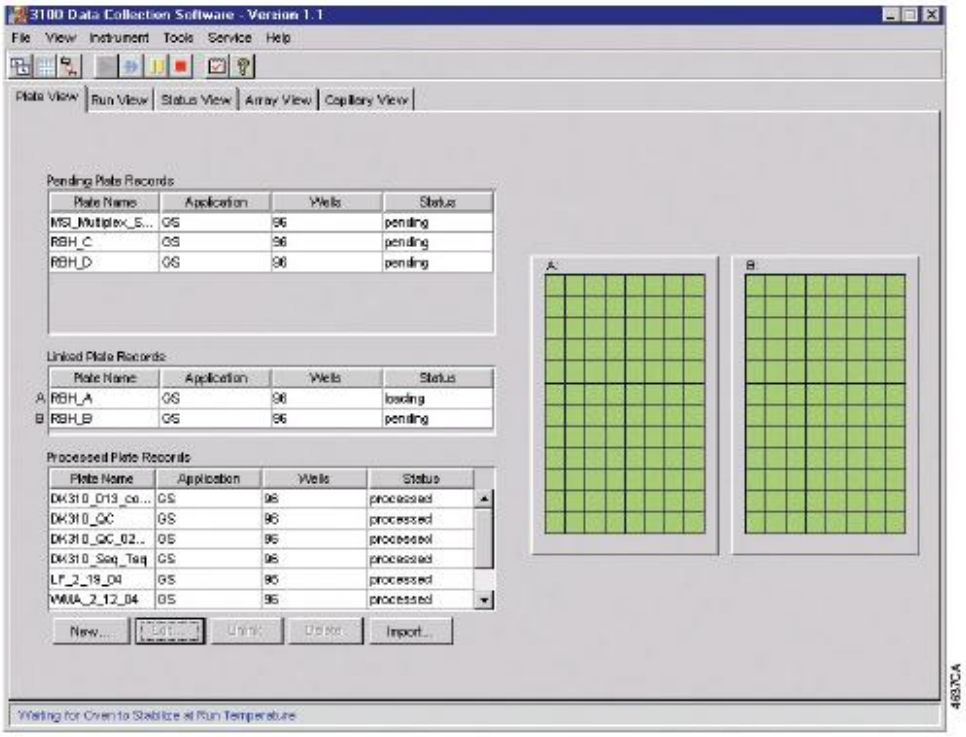


图 4. Plate View 选项卡。

13. 选择工具条上的 Run Instrument，开始运行样本。
14. 通过观察收集软件中的运行状态、阵列及毛细管视窗来监控电泳。每次运行（16 个样本）大约需要 45 分钟。

7. 使用 ABI PRISM® 3100 或 3100-Avant 遗传分析仪，2.0 版本的数据收集软件，或使用 Applied Biosystems 3130 或 3130*xl* 遗传分析仪，检测扩增片段

用户需准备的材料

- 95℃干加热块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰或冰水混合物
- 防回吸加样枪头
- 3100 或 3130 毛细管矩阵，36cm
- 性能优化的电泳胶 4 (POP-4™) （Applied Biosystems）
- 含 EDTA 的 10X 遗传分析仪缓冲液（Applied Biosystems）
- MicroAmp®透光 96 孔板和隔片（Applied Biosystems）
- Hi-Di™甲酰胺（Applied Biosystems，目录号 4311320）

- PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130（目录号 DG4650）

甲酰胺的质量对实验十分重要，请使用 Hi-Di™甲酰胺。甲酰胺应分装冻存于-20℃，反复冻融或长期储存于 4℃会导致甲酰胺的降解。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时可与 DNA 发生竞争，从而使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间可能不会增加信号强度。

甲酰胺为具有刺激性的致畸胎剂，应避免吸入及直接接触皮肤。请仔细阅读警告标签，当操作该试剂时需采取适当的防护措施。当使用甲酰胺时，请始终戴手套和防护眼镜。

7.A. 光谱校正

在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上进行光谱校正需要使用 PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130（目录号 DG4650）。在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上，不可使用 PowerPlex® Matrix Standards, 310（目录号 DG4640）生成 Matrix 文件。有关光谱校正的操作流程和进一步信息，可以参阅 *PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130 的技术手册*（#TBD022），手册可以登录网站 www.promega.com/protocols/获得。

正确进行光谱校正对在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上评估多色系统很重要。对每一台 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪都必须进行光谱校正。有关光谱校正的问题，请联系 Promega 北京技术服务部，电子邮件：chinatechserv@promega.com

7.B. 样品准备

内标（ILS 600）包含在每一个毛细管电泳样本中以使扩增样品的分析标准化，内标使用第 4 种颜色。

1. 按照以下方法混合内标（ILS 600）和 Hi-Di™甲酰胺，制备上样缓冲液：
   [(0.5µl ILS 600) + (9.5µl Hi-Di™甲酰胺)] X（电泳样本数）

   注意：可以通过增减上样缓冲液中内标的加入量，来调整分子量标准的峰值强度。内标中 100bp 片段的理想峰值为 500-1000RFU。如果峰值过低，我们建议将甲酰胺/内标的比例改为：1.0µl ILS 600 加 9.0µl Hi-Di™甲酰胺。如果峰值过高，我们建议将甲酰胺/内标的比例改为：0.25µl ILS 600 加 9.75µl Hi-Di™甲酰胺。

2. 涡旋振荡 10-15 秒。
3. 往每孔中加入 10µl 甲酰胺/内标混合液。
4. 往每孔中加入 1µl 扩增样品。用隔片将孔板覆盖。

   注意：不同仪器的检测底限存在差异，因此需要适当调整进样时间、进样电压或增减与上样缓冲液混合的扩增产物的量。在数据收集软件中，使用 Module Manager 中的 run module 来调整进样时间或

电压（见下面的“仪器准备”部分）。

5. 必要时短暂离心加样板，以去除孔中的气泡。
6. 将样本置于 95℃变性 3 分钟,立即放在碎冰上或冰水浴中冷却 3 分钟，之后尽快在遗传分析仪上进行电泳。

7.C. 仪器准备

参照 ABI PRISM® 3100 型遗传分析仪用户手册的说明进行泵的清洗、安装毛细管矩阵、进行空间校正及灌胶。

使用 2.0 版本的数据收集软件进行样品分析时，按照 ABI PRISM® 3100 或 3100-*Avant* 及 3130 或 3130*xl* 遗传分析仪用户手册的说明进行，并做如下改动：

1. 在 Module Manager 中点击“New”。在 Type 下拉菜单中选择“Regular”，然后在 Template 下拉菜单中选择“HIDFragmentAnalysis36_POP4”。确认进样时间是 5 seconds，进样电压为 3kV，将电泳运行时间延长为 2000 seconds。为您的运行模式命名，然后点击 OK。

   注意：不同仪器的灵敏度可能存在差异。因此可能需要在 Module Manager 中调整进样时间和电压。建议进样时间范围为 3-22 秒，进样电压范围为 1-3kV。

2. 在 Protocol Manager 中点击“New”，并为新的方法（protocol）命名。在 Type 下拉菜单中选择“Regular”，然后在 Run Module 下拉菜单中选择您在上一步创建的运行模式。最后，在 Dye Set 下拉菜单中选择“F”，点击 OK。
3. 按照仪器用户手册的说明在 Plate Manager 中，创建一个新的平板记录。在随后出现的对话框中找到 Application 下拉菜单并选择“GeneMapper-Generic”，然后选择合适的平板类型（96 孔板）。在所有者（owner）和操作者（operator）窗口输入备注信息后，点击 OK。

   注意：如果希望对样品数据进行自动分析，请参考仪器的用户手册。

4. 进入 GeneMapper®平板记录，在相应的孔（cell）中输入样品名称。向右拉动滚动条，在 Results group 1 栏目中选择需要的结果组。在 Instrument Protocol 1 栏目中，选择在步骤 2 中创建的方法（protocol），并确认样品名称各列均含有此信息。点击 OK。

   注意：

   1）在 Results Group 栏目的下拉菜单中选择 New，可以创建一个新的结果组。选择 General tab，输入名称。选择 Analysis tab，并在 Analysis type 下拉菜单中选择“GeneMapper-Generic”。

   2）当为相匹配的样品命名时，可以使用起始字母相同的名字，这样在分析结果被分类排序时这些样品仍能在一起。

5. 将样品放入仪器，关上仪器门。
6. 在 spectral viewer 界面中，确认 dye set F 处于激活状态，并对 dye set F 设定了正确的激活校准。
7. 打开 run scheduler，找到在步骤 3、4 中创建的样品板记录，单击名称以选中。
8. 一旦样品板记录被选中，点击与含有扩增样品的平板相对应的样品板图表（plate graphic）。
9. 当样品板记录与相应的样品板关联以后，样品板图表将从黄色变成绿色，而此时绿色的 Run Instrument 的箭头会变成可执行状态。
10. 点击工具栏中绿色的 Run Instrument 的箭头按钮，开始运行样本。
11. 通过观察收集软件中的运行状态、阵列或毛细管视窗来监控电泳。每次运行大约需要 45 分钟。

8. 数据分析

8.A. MSI 分析概述

MSI 是通过比较扩增正常样品及相匹配的待测样品 DNA 后得到的等位基因谱而检测出来的。若在待测样品中出现新的等位基因，则提示存在微卫星不稳定性（MSI）（见图 5）。 MSI 分析系统可以同时扩增和检测一组微卫星标志物，这些标志物对有错配修复缺陷的 MSI-H 样品的检测具有灵敏性和特异性。特异的 PCR 产物大小以及每个微卫星标志物标记用的染料均列在了表 1 中。

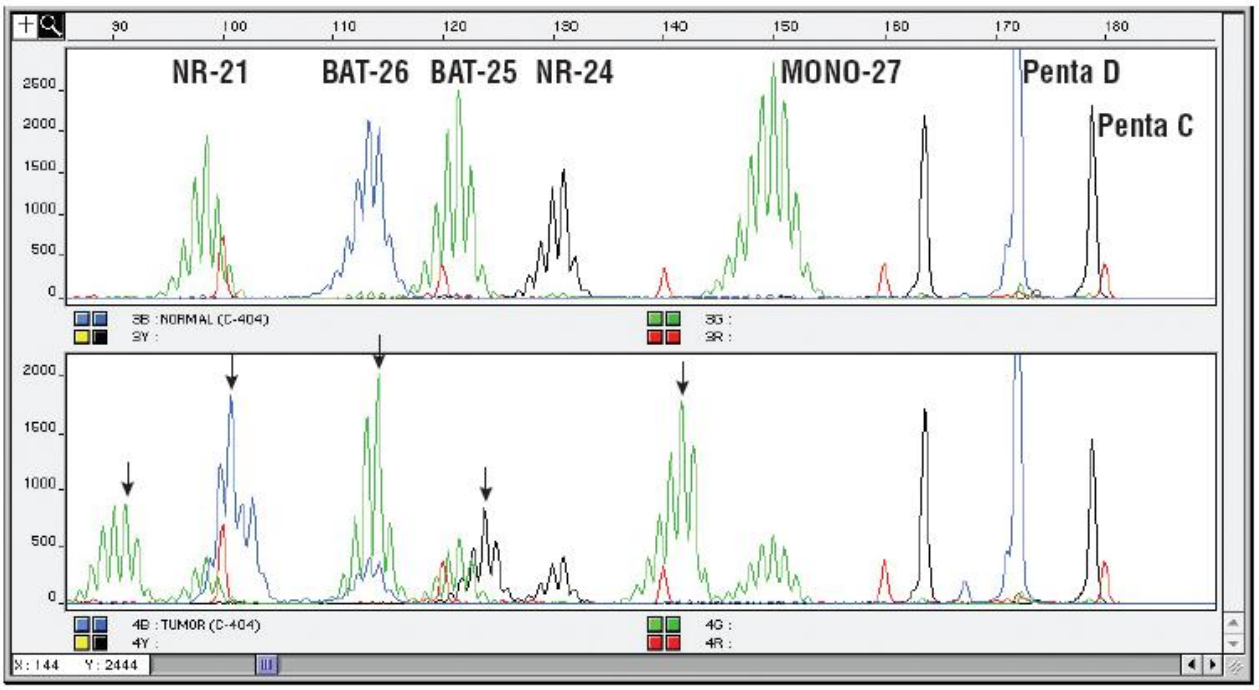


图 5. 用 MSI 分析系统进行微卫星不稳定性检测。用 MSI 分析系统分析相匹配的正常样品（上栏）和 MSI-阳性的待测样品（下栏）。 用 2ng 的基因组 DNA 进行扩增，然后用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪(使用 POP-4™胶和 36cm 毛细管)进行分析，正常和待测样品的等位基因谱如图所示。新等位基因在待测样品中出现（如箭头所示），在正常样品中不存在，提示有 MSI。PCR 产物的大小以及 MSI 分析系统中包含的基因座标记荧光染料均列在了表 1 中。

通常，样品中如果有≥40%的单核苷酸重复微卫星标志物发生改变（即 5 个标志物中有≥2 个标志物发生改变）,则可归类为 MSI-H。如果样品中发生改变的单核苷酸重复标志物小于 40% ，则可归类为‘非 MSI-H’。然而，在错配修复正常的细胞中即使一个单核苷酸标志物发生改变的情况也很罕见，因此这种情况下有必要重复 MSI 检测或用其它方法进一步分析，以便对样品进行准确分类。五核苷酸重复标志物不用于 MSI 分类之用。

微卫星标志物的扩增会产生 1 个或 2 个等位基因主峰，取决于受检个体中的相应标志物是纯合子（1 个主峰）或是杂合子（2 个主峰）。此外，由于阴影（stutter）的原因，微卫星标志物的扩增经常会产生杂峰。单核苷酸标志物的电泳峰图显示若干强度稍弱的距离真正的等位基因峰依次 1bp 间隔的阴影峰（stutter peaks）（见图 6）。对某一标志物而言，由于一个重复单元的缺失或插入而导致微卫星长度发生改变，从而使待测样品与相匹配的正常样品相比产生不同长度的等位基因，该标志物即被认定为 MSI-阳性。MSI 分析系统中包含的单核苷酸标志物几乎都是单态的，因此对某一标志物而言在大多数人中这个相同的共有等位基因都是纯合的（等位基因频率见第 10.B 部分）。

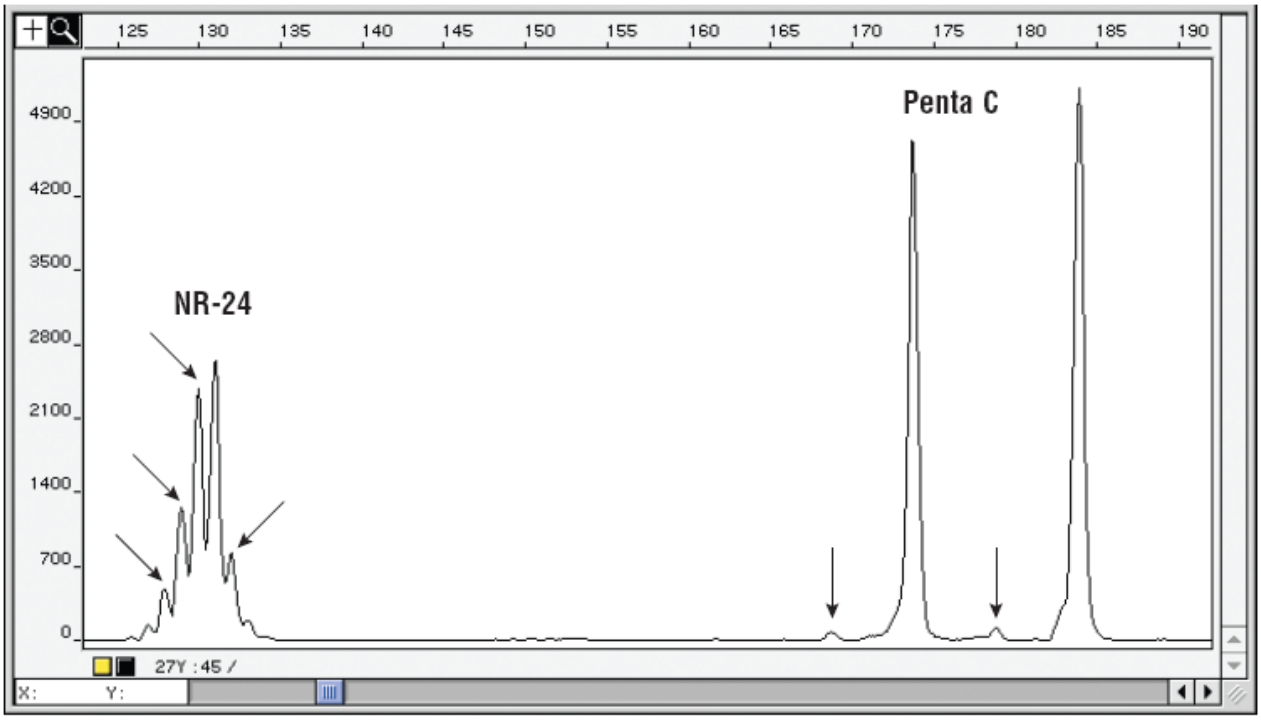


图 6. 阴影峰（Stutter peaks）。在PCR扩增短串联重复序列时由于聚合酶滑脱产生的阴影峰（如箭头所示）在单核苷酸标志物 NR-24（左）距真正的或最高的等位基因峰依次1bp距离处清楚可见。在距Penta C 标志物真正的等位基因峰5bp处也可看到小得多的阴影峰。

两个五核苷酸重复标志物 (Penta C 和 Penta D)包含在试剂盒中的目的是为了帮助核实待测样本与相匹配的正常样本是否来自同一个体。如果两个样本都来自同一个体，那么在正常样本中存在的等位基因也应该存在于待测样本中。在14%的MSI-H样本中发现Penta C有MSI，而35%的MSI-H样本中发现Penta D有MSI，由此可见，在某些MSI-H样本也可能出现额外的五核苷酸重复等位基因。 根据等位基因频率数据计算，Penta C的匹配概率在1:10到1:16之间，而Penta D的匹配概率在1:18到1:33之间。匹配概率是指若想找到两个具有相同等位基因模式的人所需要随机调查的平均人数。同时使用这两种五核苷酸标志物可以使样品混淆的检出率超过99%。

数据分析需要使用 Applied Biosystems 公司的 GeneMapper®分析软件。该软件允许对原始数据进行手工或自动分析，可以生成电泳峰图，电泳峰图附有同时显示 PCR 片段长度（以碱基对表示）和峰高（以 RFU 表示）的数据表。得到的结果应该进行复审以排除由渗透产生的杂峰以及阴影峰或毛细管电泳相关的尖刺峰（见图 6 和 7）。请参考 GeneMapper®软件用户手册以获取关于片段分析和基因分型的详细说明。为简化数据分析，我们创建了可以用 GeneMapper® 软件进行基因型自动分配的 panels 和 bins 文件。与 GeneMapper® 软件配合使用的 panels 和 bins 文件可以从下面的 Promega 网址下载：www.promega.com/resources/tools/msi-panels-and-bins-for-genemapper-software/

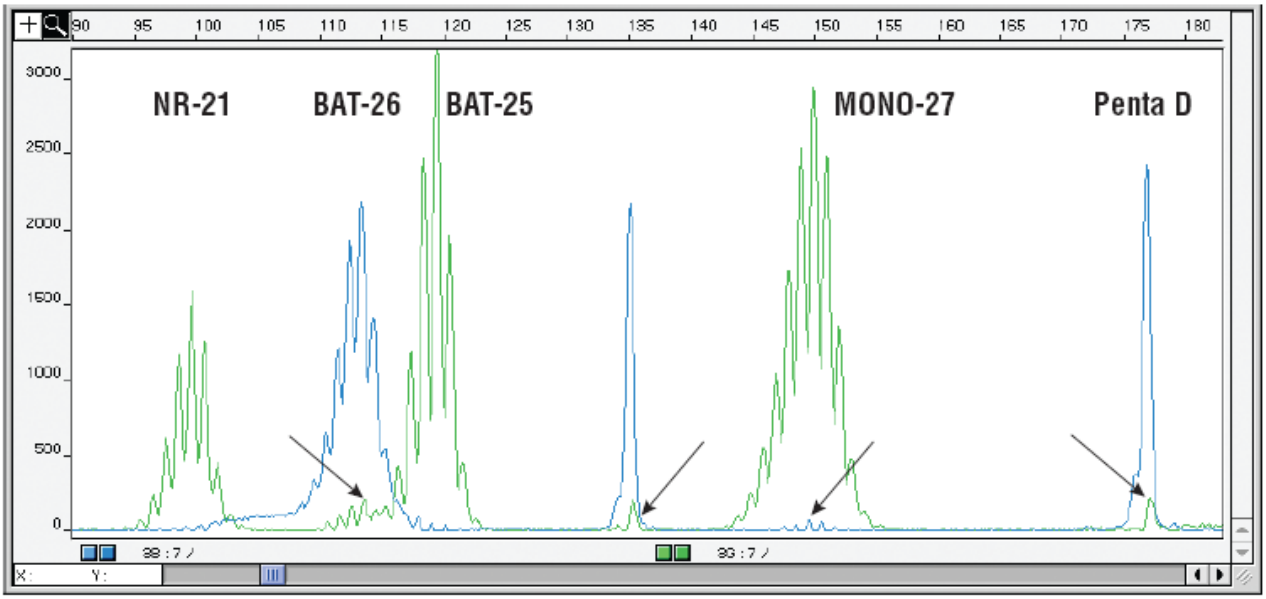


图 7. 渗透或拉升峰。 与其它颜色通道中较高的峰发生交叠的小峰（如箭头所示）称作渗透或拉升峰。渗透在峰过高时或样品所用的matrix不正确或质量不高时会出现。

8.B. 将 Panels 和 Bins 文件导入 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本）

为了便于对用 MSI Analysis System 得到的数据进行分析，我们创建了可以使用 GeneMapper® 软件（4.0 和 4.1 版本）进行基因型自动分配的 panels 和 bins 文件。对于使用 3.5 或 3.7 版本的 GeneMapper® 软件用户，我们建议升级至 4.0 或 4.1 版本，以便能更好地对 MSI Analysis System 扩增得到的单核苷酸重复和五核苷酸重复进行分析。

注意：关于 GeneMapper® *ID* 或 *ID-X* 的信息，请联系 Promega 北京技术服务部，电子邮件：chinatechserv@promega.com。更多信息请参考 GeneMapper® *ID* 或 *ID-X* 软件所提供的文件。

使用 MSI 分析系统所需要的 panels 和 bins 文件可以从下面的 Promega 网址下载：
www.promega.com/resources/tools/msi-panels-and-bins-for-genemapper-software/

1. 打开 GeneMapper® 软件，4.0 或 4.1 版本。
2. 选择“Tools”，然后选择“Panel Manager”。
3. 选中左上方导航面板中的 Panel Manager 图标。
4. 从菜单中选择“File”，然后打开“Import Panels”。
5. 在电脑中找到已经保存好的 panels 和 bins 文件，选择文件“Promega_Panels_MSI_GM4.X.txt”，然后点击“Import”。
6. 在导航面板中，选中刚导入的 Promega MSI 文件夹。
7. 选择“File”，然后打开“Import Bin Set”。
8. 在电脑中找到已经保存好的 panels 和 bins 文件，选择文件“Promega_Bins_MSI_GM4.X.txt”，然后点击“Import”。
9. 在 Panel Manager 视窗的底部，选择 OK，这时 Panel Manager 视窗会自动关闭。

8.C. 用 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本）创建数据分析方法

1. 选择“Tools”，然后选择“GeneMapper Manager”。
2. 打开 Analysis Methods 选项卡。
3. 点击“New”，会弹出一个新的分析方法对话框。
4. 选择“Microsatelite”，点击 OK。
5. 为此分析方法输入一个描述性的名称，如“Promega MSI”。

6. 选择 Allele 选项卡（见图 8）。

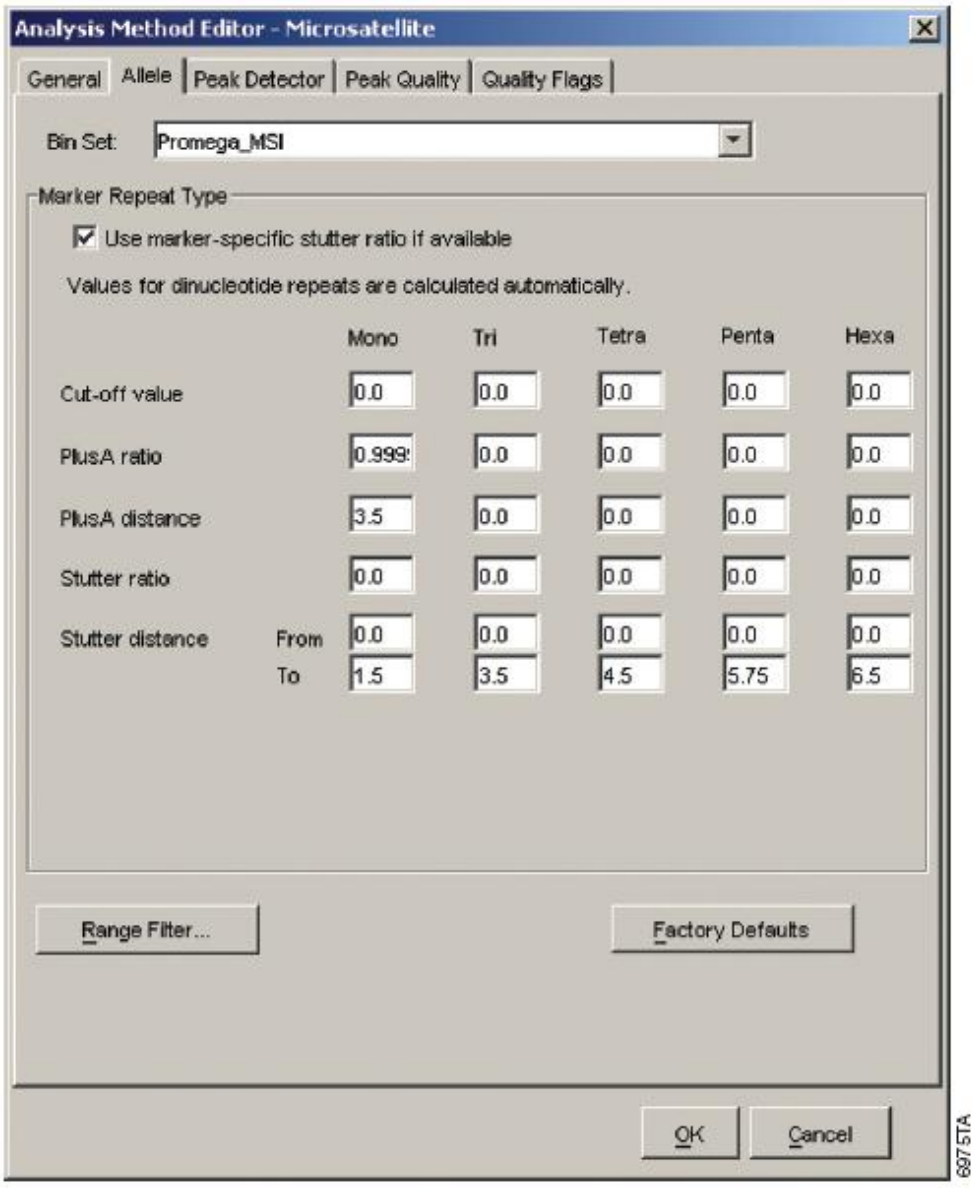


图 8. The Analysis Method Editor. 单核苷酸重复的PlusA ratio设置为0.9999。

7. 选择与 Promega MSI 系统相对应的 bin 文件 “Promega_MSI”。、
8. 确认选中”Use marker-specific stutter ratio if available”复选框。
9. 使用 MSI Analysis System 时，参照图 8 输入相应的数值以得到适当的滤过峰。这些滤光片的设置允许用户显示绘图数据，并且在每一个单核苷酸标志物的范围内的每一系列扩增片段中最高的峰被标记。如果希望使用其它的标记策略，可以改变这些设置。对于以上设置的恰当使用及其作用的进一步解释，请参见 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本）提供的文件。

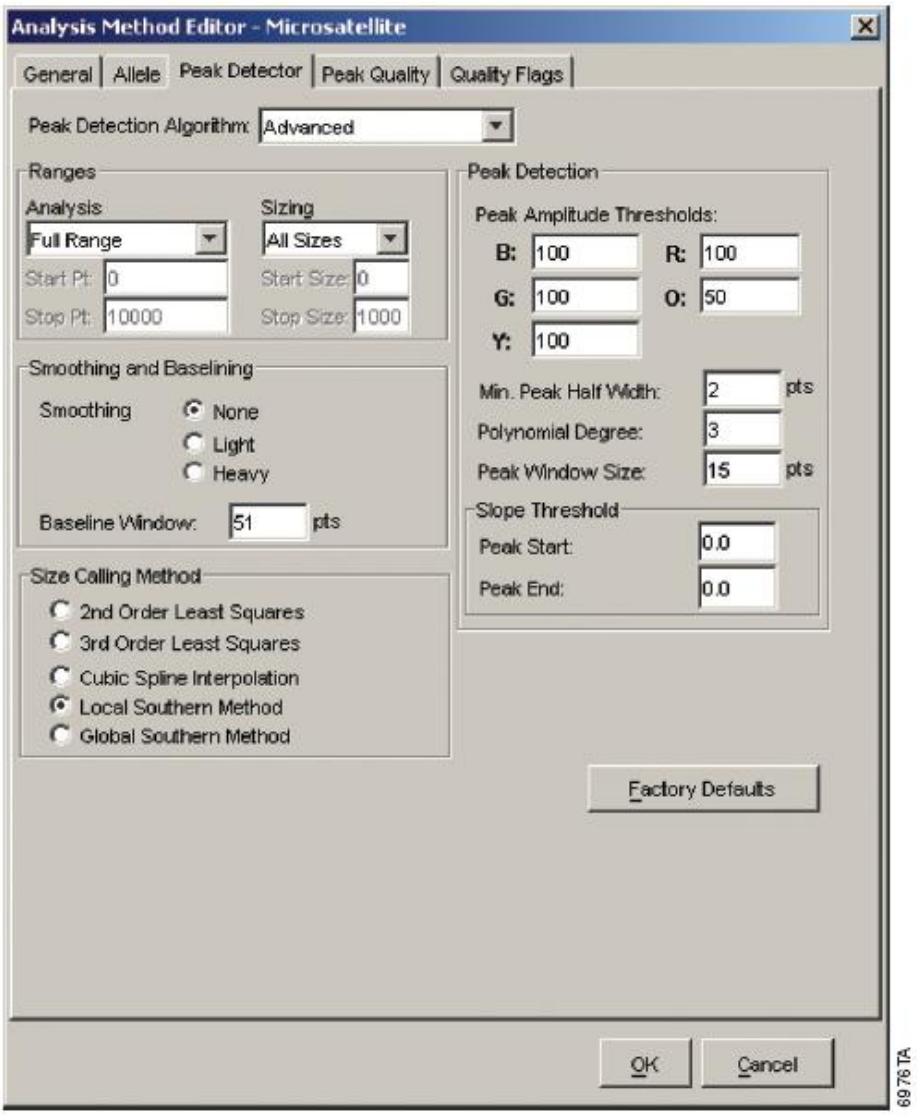


图 9. Peak Detector 选项卡推荐的设置。

10. 选择Peak Detector选项卡。我们推荐使用图9中的设置。Peak Amplitude Thresholds应该由每个实验室根据期望的样品峰强度范围、仪器的动态范围以及在数据分析中观察到的背景信号值等来确定。Peak Amplitude Thresholds 常设置在50到200RFU之间。

11. 点击“OK”，保存您的设置。

8.D. 创建片段大小标准（Size Standard）

1. 选择“Tools”，然后选择“GeneMapper Manager”。
2. 选择 Size Standard 选项卡。
3. 点击“New”。

4. 选择“Basic or Advanced”（见图 9）。所选的分析方法类型必须与先前在 Peak Detector 选项卡上所选的 Peak Detection Algorithm 分析法相匹配。点击“OK”。
5. 在 Size Standard Editor 界面输入详细的名称，如“ILS 600”。确认选择红色（Red）作为 size standard 染料的颜色。
6. 将内标片段的大小输入到表中（60，80，100，120，140，160，180，200，225，250，275，300，325，350，375，400，425，450，475，500，550 和 600 个碱基）。
7. 点击“OK”。

8.E. 数据处理

1. 在 File 菜单中选择“New Project”，然后“Microsatellite”。
2. 在 File 菜单下的“Add Samples to Project”选项将样本文件导入到新项目中。
3. 在 Sample Type 栏目的下拉菜单里，酌情选择“Sample”、“Positive Control”或“Negative Control”。
4. 在 Analysis Method 栏目中，选择在 8.C 部分创建的分析方法。
5. 在 Panel 栏目中，从 Promega MSI 文件夹中选择“Promega MSI”。该 panel 文件是在 8.B 部分导入的。
6. 在 Size Standard 栏目中，选择在在 8.D 部分创建的分子量标准。
7. 如果分析来自 ABI PRISM® 310 型遗传分析仪的数据，须确保在 Matrix 栏中选择适当的 Matrix 文件。
8. 选择“Analyze”（绿色箭头按钮），开始数据分析。

8.F. 复审片段大小标准（Size Standard）

如果正确标记，内标（ILS 600）给出的 Sizing Quality score 应该接近 1.0。内标分析中出现的问题（额外峰，错误标记，等等）会使 Sizing Quality score 处于 0.0 到 1.0 之间，并且可能导致样本分析失败。如果分析失败，但是片段被正确分配，那么可以通过选择“Override SQ”来覆盖 Sizing Quality，这样样本就可以重新被分析了。进一步的信息请参见 GeneMapper®软件（4.0 和 4.1 版本）提供的文件。

1. 在 Samples 选项卡中选择“Edit”，然后“Select All”，以选择所有的样品。
2. 选择“Analysis”，然后“Size Math Editor”，这样就打开了 Size Math Editor。
3. 查看 Size Matches 选项卡以复审 Size Quality score、每个样品的片段大小标准峰及峰标记。
4. 确定是否片段大小标准中的所有峰都存在，并且 ILS 600 是否如图 2 所示被正确标记。

8.G. 复审样本数据分析

GeneMapper®软件为样本数据显示提供了多种选择。Promega MSI Analysis System 的 panels 和 bins 文本文件下载包包括一个信息文件和一个绘图设置文件的例子，描述了复审样本数据的一个选择方案。进一步的信息请参考 GeneMapper®软件 4.0 或 4.1 版本：安装和管理指南（Installation and Administration Guide）。

9. 常见问题与解决方案

对此处未涉及的问题，请联系 Promega 北京技术服务部（电子邮件：chinatechserv@promega.com）或当地特约经销商（联系方式可从 www.promega.com.cn 获得）。

对使用 GeneMapper® 软件（4.0 和 4.1 版本）所遇到的问题，请参考 *GeneMapper® Software, Versions 4.0 and 4.1 Reference and Troubleshooting Guide*.

现象	原因	评论
等位基因峰荧光信号弱	模板 DNA 不足	确保对 DNA 进行准确定量，使用推荐量的模板 DNA。
	DNA 降解	重新制备基因组 DNA。
	DNA 模板不纯	DNA 样品中的杂质可能抑制 PCR 反应。纯化 DNA 模板，或重新制备基因组 DNA。
	DNA 质量差	如果石蜡包埋的样本固定方式不当或固定时间过长，会导致提取到的 DNA 产率低并且质量差。重新制备 DNA。我们推荐的 DNA 纯化产品参见第 3 部分。
	毛细管电泳进样差（内标 ILS 600 峰也受影响）	重新进样。检查注射器泵系统是否泄漏。检查激光源。
	甲酰胺质量差	分析样品时只使用 Hi-Di™甲酰胺。
	盐浓度过高或 pH 改变	如果 DNA 模板储存在 pH 不是 8.0 或含有过高 EDTA 的 TE 缓冲液中，那么 DNA 模板的体积不应超过总反应体积的 20%。从 DNA 样本中带入的 K^+, Na^+, Mg^{2+}或 EDTA 会抑制 PCR 反应。pH 的改变也会影响 PCR 反应。
	热循环仪或离心管问题	确认 PCR 程序设置是正确的。使用推荐的热循环仪和离心管。必要的话，需校正热循环仪的加热模块。
	上样前样品没有进行恰当的变性	将样品按推荐的时间进行热变性，并迅速置于碎冰或冰水浴中冷却，然后及时上样电泳。
	扩增反应组分没有加到管子或孔的底部	轻弹样品管或样品板使液体移到底部，或者短暂离心。
等位基因峰荧光信号过强	模板 DNA 过量	• 确保对 DNA 进行准确定量，在 PCR 反应中使用 1-2ng DNA。 • 将 PCR 产物用无菌去离子水或 1X Gold ST★R 缓冲液 1:5 到 1:10 倍稀释后，再准备上样缓冲液。

在一个或所有颜色通道中出现额外的杂峰	微卫星杂峰（如，阴影峰）	微卫星基因座的扩增会产生杂峰，这些杂峰较小，出现在距最显著的单核苷酸重复等位基因 1bp 上下或出现在距五核苷酸重复等位基因 5bp 之下。如果模板 DNA 用量过多，则 stutter 产物峰会更高。
	DNA 用量过多	我们推荐使用 1-2ng DNA。使用>2ng 的 DNA 模板可能会导致更多的 stutter 产物。建议减少 DNA 模板用量，或者将扩增程序的循环数降低 2 个或更多。
	拉升或渗透	当峰值过高或者应用于样本的 Matrix 质量不高或不正确时，就会出现拉升现象。在分析方法中提高峰的振幅阈值（amplitude threshold）（即，150-200RFU），然后重新分析。如果问题仍然存在，则需要生成一个新的 Matrix 或重新进行光谱校正，然后将新的 Matrix 应用于样本。
	上样前样品没有进行恰当的变性	将样品按推荐的时间进行热变性，并迅速置于碎冰或冰水浴中冷却，然后及时上样电泳 。
	毛细管电泳相关的杂峰（污染物）	用于 ABI PRISM® 310 遗传分析仪的水和稀释 10X 遗传分析仪缓冲液的水如果存在污染物，则可能会在蓝色和绿色通道产生非特异峰。使用高压灭菌水，更换小瓶，清洗缓冲液储存器。
	污染了另外一种模板 DNA 或以前扩增的 DNA	交叉污染可能会是一个问题。使用防回吸的枪头，并勤换手套。
较小基因座优先扩增	样本中的 DNA 交联	从石蜡包埋的样本中提取的 DNA 经常会与其它 DNA 或蛋白质发生交联，从而阻碍较长 DNA 片段的扩增。
	DNA 降解	DNA 模板降解成小片段，因而较大的基因座扩增产率下降。
	模板 DNA 不足	使用推荐量的模板 DNA。
	模板 DNA 过量	我们推荐使用 1-2ng DNA。使用>2ng 的 DNA 模板扩增可能会导致产率不平衡，使较小基因座产生的扩增产物多于较大基因座。建议减少 DNA 模板用量，或者将扩增程序的循环数降低 2 个或更多。

10. 附录

10.A. 相关产品

产品	规格	目录号
Maxwell® 16 MDx Instrument	1 台	AS3000
Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit	48 次	AS1130
ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	10 个反应	A2351
	100 个反应	A2352
MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System	100 个样品	MD1490
ART® 20P Pipet Tip, 20µl	960 个/包	DY1071
ART® 100 Pipet Tip, 100µl	960 个/包	DY1101
ART® 100E Pipet Tip, 100µl	960 个/包	DY1111
ART® 200 Pipet Tip, 200µl	960 个/包	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip, 1,000µl	800 个/包	DY1131

10.B. 单核苷酸重复基因座的等位基因频率

BAT-25			
Size (bp)	Caucasian-American	African-American	Asian-American
113	1	1	0
114	0	1	0
115	0	12	0
116	0	7	0
117	0	1	0
118	0	8	0
119	0	14	0
120	7	111	4
121	108	103	93
122	58	12	30
123	8	5	0
124	0	0	0
n =	182	274	127

BAT-26			
Size (bp)	Caucasian-American	African-American	Asian-American
103	0	23	0
104	0	0	0
105	0	0	0
106	0	2	1
107	1	0	0
108	0	0	0
109	0	0	0
110	0	0	0
111	0	4	0
112	14	38	3
113	140	131	115
114	22	57	8
115	0	0	0
n =	177	255	127

NR-24			
Size (bp)	Caucasian-American	African-American	Asian-American
130	60	197	49
131	113	34	77
132	0	0	0
133	0	2	2
n =	173	233	128

MONO-27			
Size (bp)	Caucasian-American	African-American	Asian-American
142	0	1	0
143	0	0	0
144	0	0	0
145	0	0	0
146	0	0	0
147	0	0	0
148	0	3	0
149	59	88	42
150	107	141	83
151	5	4	1
152	0	1	0
153	0	0	0
154	0	1	0
155	0	0	1
n =	172	239	127

NR-21			
Size (bp)	Caucasian-American	African-American	Asian-American
94	1	2	8
95	1	0	0
96	0	3	0
97	0	60	0
98	27	100	14
99	134	62	89
100	14	9	23
101	1	0	1
n =	178	236	135

等位基因大小是用ABI PRISM® 3100遗传分析仪、使用POP-4™胶和36cm毛细管测定的。

注意：当使用不同的电泳胶和/或仪器配置时得到的等位基因大小可能会有差异。