



Part# CTMD012

PowerPlex[®] 16 System

DC6530和DC6531产品使用说明

原英文技术手册号码: TMD012

PowerPlex[®]16 系统

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

I. 介	~绍3	
II. हे	^立 品组分及存储条件5	
III. <u>é</u>	实验前必读7	
A	A. 警示	
E	3. Matrix 生成或光谱校正9	
IV.	使用 PowerPlex [®] 16 系统进行 DNA 扩增的步骤	
ŀ	A. 建立扩增系统1	0
E	3. 扩增热循环参数设置13	3
V . {	义器设置与样品准备1	5
ŀ	A. 使用 ABI PRISM [®] 3100 或 3100-Avant 型遗传分析仪,使用 Version 2.0 版本数据	居
收集	软件,或者,使用 Applied Biosystems 3130 或 3130xl 型遗传分析仪,使用 Versio	n
3.0	版本数据收集软件,检测扩增片段15	5
E	3. 用 ABI PRISM [®] 3100 遗传分析仪,使用 Version 1.0.1 或 1.1 版本数据收集软件,	
检测	打增片段18	
C	C. 用 ABI PRISM [®] 310 型遗传分析仪检测扩增片段22	

O Promega

D. 用 ABI PRISM [®] 377 型 DNA 测序仪检测扩增片段	25
VI. 数据分析	30
A. 用 GeneMapper [®] ID Version 3.2 软件对 PowerPlex [®] Panel 和 Bin 进行	设置30
B. 用 GeneMapper [®] ID 软件创建 Casework 分析程序	32
C. 用 GeneMapper [®] ID 软件创建数据库或亲子鉴定分析程序	
D. 用 GeneScan [®] 软件和 PC 操作系统进行样本分析	41
E. 用 GeneScan [®] 软件和 Macintosh [®] 操作系统进行样本分析	43
F. 用 Genotyper [®] 软件和 PowerTyper [™] 16 Macro 系统进行样本分析	45
G. 对照	48
H. 结果	49
VII. 问题及解决方案	51
A. 扩增及片段检测	51
B. GeneMapper [®] ID 分析软件	57
C. PowerTyper [™] 16 Macro	61
VIII. 参考文献	64
IX. 附录	65
A. STR 分型优势	65
B. 用于 PowerPlex [®] 16 系统的基因座优势	65
C. 识别率	69
D. DNA 的提取和定量方法	71
E. 内标 ILS 600	72
F. PowerPlex [®] 16 系统反应混合液的制备	72
G. 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳(可选择应用)	73

O Promega

H. 缓冲液和反应溶液的组分	74
I. 相关产品介绍	75

I. 介绍

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

PowerPlex[®] 16系统可以进行16个基因座(15个STR位点和1个性别位点)的 复合扩增并用三色荧光进行检测。系统内的基因座包括,Penta E,D18S51, D21S11,TH01,D3S1358,FGA,TPOX,D8S1179,vWA,Amelogenin,Penta D,CSF1PO,D16S539,D7S820,D13S317和D5S818。这些位点中,Penta E, D18S51,D21S11,TH01和D3S1358的特异引物使用荧光素标记(FL);FGA, TPOX,D8S1179,vWA和Amelogenin的特异引物使用羟基一四甲基罗丹明标记 (TMR);Penta D,CSF1PO,D16S539,D7S820,D13S317和D5S818的特 异引物使用6-羟基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基-荧光素标记(JOE)。全部的16个位 点在一管中同时扩增,然后通过单一进样或单一胶道进行电泳分析。

PowerPlex[®] 16 Monoplex系统包括Penta E(荧光素标记)(Cat.# DC6591) 和Penta D(JOE标记)(Cat.# DC6651),每个单一位点系统可以单独扩增Penta E或Penta D一个位点,这样可以对由PowerPlex[®] 16系统、PowerPlex[®] 16 BIO系 统或PowerPlex[®] 2.1系统得到的结果进行验证。另外,如果由于扩增条件不是最 优或DNA样本质量不佳,而导致一个或多个位点扩增失败,单一位点系统还可以 对DNA样本进行再次扩增。

PowerPlex[®] 16系统适用于ABI PRISM[®] 310, 3100和3100-Avant型遗传分析 仪、Applied Biosystems 3130和3130x/型遗传分析仪以及ABI PRISM[®] 377 DNA



测序仪上进行电泳分析。Promega公司已对本手册中的操作流程进行了试验。但 是由于扩增及检测仪器的差异,各个实验室需要根据自己的仪器对试验中循环参 数和进样时间(或上样体积)进行调整优化。此外,还需进行实验室有效性验证。

PowerPlex[®] 16系统提供除AmpliTaq Gold[®] DNA聚合酶以外的所有扩增纯化的基因组DNA STR 区域所需的试剂。本操作手册分别介绍了使用Perkin-Elmer 480型和GeneAmp[®] PCR系统9600,,9700和2400型热循环仪扩增PowerPlex[®] 16系统的操作程序以及扩增产物分离、检测的操作流程(Figure 1)。荧光检测仪器的操作说明可以从仪器制造商处获取。

如需获取进一步的Promega公司荧光STR系统的信息及银染法检测STR扩增 片段的方法,请登陆网站:<u>www.promega.com</u>或与 Promega 公司联系。



Macintosh® Operating

Systems

	Amplification Setup	
Section IV.A		
	Thermal Cycling	
Section IV.B GeneAmp® PCR System 9700 GeneAmp® PCR System 9600 GeneAmp® PCR System 2400 Model 480 Thermal Cycler		
1		
Instru	ment Setup and Sample Prepa	ration
Section V.		
Applied Biosystems 3130 or 3130 <i>xl</i> Genetic Analyzer with Data Collection Software, Version 3.0 <i>Section V.A.</i>	ABI PRISM [®] 3100 or 3100- <i>Avant</i> Genetic Analyzer with Data Collection Software, Version 2.0 <i>Section V.A.</i>	ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyzer with Data Collectior Software, Version 1.0.1 or 1. Section V.B.
ABI PRISM® 310 Analyzer <i>Section V.C.</i>	Genetic ABI PRISM® 377 Sequencer Section V.D.	DNA
	Data Analysis	
Section VI.		
GeneMapper® /D Software	GeneScan [®] Software and	GeneScan® Software and

Figure 1. PowerPlex[®] 16 System 操作流程概览

PC Operating Systems

Ⅱ. 产品组分及存储条件

Versions 3.1 and 3.2

产品	规格	目录号
PowerPlex [®] 16 System	100个反应	DC6531

此产品不得用于医疗诊断。

Cat.# DC6531提供的的试剂,足够以25µl反应体系进行100次反应。其中包括:



扩增前试剂盒成份(蓝色管盖)

- 1 × 300µl Gold ST★R 10×Buffer
- $1 \times 250 \mu$ l PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix
 - 25µl 9947A DNA (10ng/µl)

扩增后试剂盒成份(米黄色管盖)

1 × 25µl	PowerPlex [®] 16 Allelic Ladder Mix
1× 150µl	Internal Lane Standard (ILS) 600
1	技术手册

产品	规格	目录号
PowerPlex [®] 16 System	400个反应	DC6530

此产品不得用于医疗诊断。

Cat.# DC6530提供的的试剂,足够以25µl反应体系进行400次反应。其中包括: 扩增前试剂盒成份(蓝色管盖)

- 4 × 300µl Gold ST★R 10×Buffer
- 4 × 250µl PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix
 - 25µl 9947A DNA (10ng/µl)

扩增后试剂盒成份(米黄色管盖)

- $4 \times 25\mu$ l PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder Mix
- 4× 150µl Internal Lane Standard (ILS) 600
 - 1 技术手册



中。包装开启后应置于"扩增后"的盒中。

储存条件:所有组分必须于-20°C冻存。PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix、 PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder Mix及Internal Lane Standard 600均对光敏感,必须 避光保存。并且,扩增前试剂于扩增后试剂要分开保存与使用。

单独提供的产品

产品	规格	目录号
Blue Dextran Loading Solution [*]	3ml	DV4351
PowerTyper. Macros (Release 2.0)**	1 CD-ROM	DG3470

实验室专用

不得用于医疗诊断

Promega公司免费为您提供与Genotyper[®]软件一起使用的PowerTyper[™] Macros(2.0版本)软件。CD-ROM中包含与PowerPlex[®] 16系统配合使用的 PowerTyper[™] Macro(2.0版本)软件。您也可以从网站:

www.promega.com/geneticidtools/下载本软件。

与GeneMapper[®] *ID*软件一起使用的相关的配套文件,您可以从Promega的网站: <u>www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/</u>获得。

Matrix standard用于初始建立不同色的光谱矩阵文件,可以针对不同的分析仪型号单独购买。包括ABI PRISM[®] 310遗传分析仪和377 DNA测序仪的PowerPlex[®] Matrix Standards, 310; ABI PRISM[®] 3100、3100-*Avant*型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130和3130*xI*型遗传分析仪的PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130。详细定购信息请参阅本手册章节IX.I(见75页)。

Ⅲ. 实验前必读

III.A. 警示及预防



此手册中未包含法庭及侵权案件中基于PCR的基因分型的应用需要有效性的研究及质量控制措施(11,12)。

DNA样品纯化的质量、缓冲液的微小差异、离子强度、引物浓度,热循环仪的选择及热循环条件等都可能影响PCR的反应成功与否,因此我们建议客户严格 遵照操作手册推荐的扩增、变性胶电泳及荧光检测实验程序。

微量的非模板人类DNA会对基于PCR的STR分析产生污染。当制备样品DNA、 处理引物对、进行扩增反应及分析扩增产物是,都要竭力避免交叉污染。扩增前 使用的试剂和原料(Gold ST★R 10×Buffer and PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix)应存放于一个单独的盒子中,并且要与扩增后使用的试剂和原料

((PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder Mix和Internal Lane Standard 600)分开保存。 每次反应须设立没有模板DNA的阴性对照反应来监测试剂是否存在污染。我们强 烈推荐您使用手套及防回吸加样头(如ART[®] tips,见章节IX.I(见75页))

一些用于STR产物分析的试剂含有潜在的毒性作用,应按照要求操作。Table 1列出了相关试剂的潜在毒性。

Table 1. 毒性试剂

适用于ABI PRISM[®] 310, 3100, 3100-Avant型遗传分析仪及

Applied Biosystems 3130和3130 <i>xI</i> 型遗传分析仪的试剂	危险性
甲酰胺	刺激,致畸
适用于ABI PRISM [®] 377 DNA测序仪的试剂	危险性
丙稀酰胺(Long Ranger [®] 凝胶溶液)	可疑致癌物质,有毒
过硫酸铵	氧化剂、腐蚀剂

	Promega
甲酰胺(包含在Blue Dextran Loading Solution中)	刺激, 致畸
TEMED	腐蚀剂,可燃
尿素	刺激

III.B. Matrix生成或光谱校正

在ABI PRISM[®] 310, 3100和3100-Avant型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130、3130x/型遗传分析仪上生成正确的Matrix文件,对评估多色荧光系统是非常关键的。并且,每台分析仪都要有自己的Matrix文件。

PowerPlex[®] Matrix Standards, 310(Cat.# DG4640)是专门为ABI PRISM[®] 310遗传分析仪和ABI PRISM[®] 377 DNA测序仪进行Matrix标准化的。为了得到最 佳的实验结果,在ABI PRISM[®] 310遗传分析仪上,不可使用PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130(Cat.# DG4650)生成Matrix文件。

PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130(Cat.# DG4650)是专门为ABI PRISM[®] 310, 3100和3100-*Avant*型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130、 3130*xI*型遗传分析仪进行光谱校正的。在这些仪器上,不可使用PowerPlex[®] Matrix Standards, 310(Cat.# DG4640)生成Matrix文件。

有关Matrix标准化的操作流程和进一步的信息,可以参阅与产品DG4640同时 附送的PowerPlex[®] Matrix Standards, 310, 技术手册 #TBD021。有关光谱校正的 操作流程及进一步的信息,可以参阅与产品DG4650同时附送的PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130, 技术手册 #TBD022。这些手册可以从Promega公 司或登陆网站 www.promega.com/tbs/ 获得。

IV. 使用PowerPlex[®] 16系统进行DNA扩增

用户准备的材料

• 热循环仪Thermal Cycler Model 480或GeneAmp[®] PCR System 9600,

9700或2400 (Applied Biosystems)

- 微量离心机
- 0.5ml或0.2ml薄壁微量离心管或MicroAmp[®]透光96孔反应板(Applied Biosystems)
- 1.5ml琥珀色微量离心管(Fisher, Cat.# 05-402-26)
- 防回吸吸头(参见章节IX.I,见55页)
- AmpliTaq Gold[®] DNA聚合酶(Applied Biosystems)
- 无核酸酶纯净水(Cat.# P1193)
- 石蜡油(Cat.# DY1151,用于Thermal Cycler Model 480)

根据下面的操作流程,我们在25µl反应体系中加入0.5-1ng模板DNA。由于小 片段基因座的优势扩增,如果加入过多的模板量,会出现小片段基因座相对峰高、 大片段基因座相对峰低的现象。这时减低模板量或减少循环次数可以纠正这个现 象。

使用GeneAmp[®] PCR System 9700热循环仪对PowerPlex[®] 16系统进行扩增的方法经过了优化。此外,本手册还提供了使用GeneAmp[®] PCR System 9600, 9700和2400热循环仪及Perkin-Elmer model 480热循环仪进行扩增的方法。

IV.A. 扩增体系建立

为了防止交叉污染,我们强烈建议在试验过程中使用手套和防污染加样头。 必须将所有扩增前试剂和扩增后试剂分别放于不同的实验室。在专门的实验室内 配制扩增反应液,使用专门的仪器设备进行扩增反应。

① 扩增时需要特别小心,我们在章节VII.A(见37页)提供了一些扩增中可能遇
 到的问题及解决方案。

1、融化Gold ST★R 10×Buffer和PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix。



注意: (1)、每次使用前须将试剂漩涡振荡15秒以充分混匀。不要离心 10×Primer Pair Mix,那样会将引物离心至管底。

(2)、如果在Gold ST★R 10×Buffer中出现沉淀物质,可在37°C温浴, 并漩涡振荡使之溶解混匀。

2、确定扩增样品数目,其中包含阴性及阳性对照。然后再增加1-2个反应数 以抵消移液误差。这个步骤也许会浪费少量试剂,但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相同体积的反应液。

3、将一次性0.2m或0.5ml反应管置于架上并正确标记,或者使用MicroAmp[®]反应板并正确标记。

注意:如果使用GeneAmp[®] PCR System 9600, 9700和2400热循环仪,则建 议使用MicroAmp[®]8联反应管或MicroAmp[®]反应板。对于Perkin-Elmer model 480 热循环仪,我们推荐使用0.5ml的GeneAmp[®]薄壁反应管。

4、将PCR各反应组分的终体积(参照Table 2)加至1.5ml无菌琥珀色小管中, 轻微混匀。

Table 2中显示了每个反应中的组分体系组成。在章节IX.F(见53页)中我们 向您提供了PCR反应液中每种成份用量的计算表。

Table 2 PowerPlex[®] 16系统扩增混合液

PCR反应混合液组分	一份样本所加体积
去核酸酶纯净水	18.2µl
Gold ST★R 10×Buffer	2.5µl
PowerPlex [®] 16 10×Primer Pair Mix	2.5µl
AmpliTaq Gold [®] DNA聚合酶	0.8µl
DNA模板(0.5-1ng/µl)	1.0µl
反应总体系	25µl

1、先在PCR混合液中加入去核酸酶纯净水,然后依次加入Gold ST★R 10×Buffer、

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012



PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix和AmpliTaq Gold[®] DNA聚合酶。在步骤6中会加入DNA模板。

2、标准的AmpliTaq Gold[®] DNA聚合酶浓度为5u/µl。如果酶的浓度有所不同,那么加入到PCR混合液中的酶的体积就要做相应的变动。

3、DNA模板要溶解在去核酸酶纯净水或TE⁻⁴缓冲液(10mM Tris HCI [pH 8.0], 0.1mM EDTA)。如果溶解DNA模板的TE缓冲液PH值不为8.0、或者浓度过高,则DNA模板溶液的加 入体积不应超过最后PCR反应液总体积的20%。PCR反应的扩增效率以及扩增质量与反应环 境的PH值(取决于Tris-HCI的加入量)、镁离子浓度(取决于EDTA的螯和作用)或者其他PCR 抑制物等有关,这些成分的浓度也许很低,这取决于DNA模板的质量和DNA提取方法。

●当扩增的模板DNA量大于1ng时会导致位点之间峰值高度的不平衡,短片段位点的扩增产量会高于长片段位点。这时,将扩增程序中的循环数减少2至4个循环(例如,10/20或10/18个循环),或改善位点间的平衡。

5、将混合的PCR反应液分装至每个反应管中。

6、向含有PCR反应液的反应管中加入相应样本的DNA模板(0.5-1 ng)。

7、设置扩增的阳性对照。稀释9947A DNA,使其在加入与样本相同的体积中含有0.5ngDNA。将稀释后含有0.5ngDNA的9947A加入到相应的装有PCR反应液的反应管中。

8、设置扩增的阴性对照。将无核酸酶的纯净水(代替DNA模板)加入到相应的装有PCR反应液的反应管中。

9、如果您使用GeneAmp[®] PCR System 9600,9700或2400型热循环仪和 MicroAmp[®]反应管或反应板,则无需在反应管中加入石蜡油。但是,如果您使用 的是480型热循环仪和GeneAmp[®]反应管,则需要在每个反应管中加入1滴石蜡油。

注意:将石蜡油沿管壁滴下,覆盖PCR反应液,以防止PCR反应液蒸发或由于高



温致使PCR反应液喷溅而引起的交叉污染。

IV.B. 扩增循环参数设置

本操作手册提供使用Perkin-Elmer 480型和GeneAmp[®] PCR system 9600, 9700和2400型热循环仪扩增PowerPlex[®] 16 System的操作流程。有关其他型号热 循环仪的相关信息请e-mail联系Promega技术服务部:

Chinatech@promega.com。

由于不同实验室扩增与检测仪器的灵敏度不尽相同,您需要根据您实验室仪器的性能优化试验条件,包括扩增循环数、模板上样体积及电泳进样时间等。 Promega公司的测试结果显示,纯化后的DNA模板量在0.5-1ng时,10/22个循环可以得到良好的扩增结果。对于高量的DNA模板(例如FTA[®]纸卡)或者为了降低灵敏度,而减少循环数,例如10/16,10/18或10/20,则需要进一步的优化评估。必须进行实验室内的相关认证。

1、 将反应管或MicroAmp[®]反应板置于热循环仪中。

 选择并运行推荐的操作程序。下面提供了使用GeneAmp[®] PCR system 9600,9700和2400型和Perkin-Elmer 480型热循环仪进行扩增的 推荐程序。

3、 热循环程序结束后,将扩增产物置于避光的盒子中保存在-20°C。 注意:将扩增产物保存在4°C或4°C以上的环境中,很可能会使产物降解。



Protocol for the GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler ¹	Protocol for the GeneAmp® PCR System 2400 Thermal Cycler
95°C for 11 minutes, then:	95°C for 11 minutes, then:
96°C for 1 minute, then:	%°C for 1 minute, then:
ramp 100% to 94°C for 30 seconds ramp 29% to 60°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 10 cycles, then:	ramp 100% to 94°C for 30 seconds ramp 100% to 60°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 10 cycles, then:
ramp 100% to 90°C for 30 seconds ramp 29% to 60°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 22 cycles, then:	ramp 100% to 90°C for 30 seconds ramp 100% to 60°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 22 cycles, then:
60°C for 30 minutes	60°C for 30 minutes
4°C soak	4°C soak
Protocol for the GeneAmp® PCR System 9600 Thermal Cycler	Protocol for the Perkin-Elmer Model 480 Thermal Cycler
95°C for 11 minutes, then:	95°C for 11 minutes, then:
96°C for 1 minute, then:	96°C for 2 minutes, then:
94°C for 30 seconds ramp 68 seconds to 60°C (hold for 30 seconds) ramp 50 seconds to 70°C (hold for 45 seconds) for 10 cycles, then:	94°C for 1 minute 60°C for 1 minute 70°C for 1.5 minutes for 10 cycles, then:
90°C for 30 seconds ramp 60 seconds to 60°C (hold for 30 seconds) ramp 50 seconds to 70°C (hold for 45 seconds) for 22 cycles, then:	90°C for 1 minute 60°C for 1 minute 70°C for 1.5 minutes for 22 cycles, then:
60°C for 30 minutes	60°C for 30 minutes
4°C soak	4°C soak

¹ 当运行 GeneAmp[®] PCR 9700 型热循环仪时,必须设置循环程序中描述的温度变化速率,并

且此程序必须在 9600 斜率模式(Ramp Mode)下运行。

温度变化速率的设置在 Ramp Rate Modification 界面。当浏览循环程序时,通过点击"More",

然后选择"Modify",就可以看到 Ramp Rate Modification 界面。在 Ramp Rate Modification 界面,每步温度变化速率都默认为 100%。每个保温步骤下面的速率就是变温至此温度的速率。

Figure 2显示了 GeneAmp[®] PCR 9700 型热循环仪中的温度变化速率。

选择"Start"启动热循环程序,即可以看到"Select Method Options"界面,此时可以设置



"斜率模式",选择"9600 Ramp Mode",然后输入反应体积。

V. 仪器设置及样品准备

V.A. 使用 ABI PRISM[®] 3100 或 3100-Avant 型遗传分析仪,使用 Version 2.0 版本数据收集软件,或者,使用 Applied Biosystems 3130 或 3130xl 型遗传分析 仪,使用 Version 3.0 版本数据收集软件,检测扩增片段

用户准备的材料

- 95°C加热模块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰和冰水混合物
- 防回吸吸头
- 3100或3130毛细管矩阵, 36cm
- 用于3100或3130的Performance Optimized Polymer 4 (POP-4[™])
- 含 EDTA 的 10×遗传分析仪缓冲液
- MicroAmp[®]透光 96 孔板和隔片
- Hi-Di[™]甲酰胺(Applied Biosystems, Cat.# 4311320)
- PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130 (Cat.# DG4650)

● 甲酰胺的质量对试验很重要,使用电导率小于100µS/cm的Hi-Di[™]甲酰胺。甲酰胺应分装置于-20°C冻存,反复冻融或长时间的置于4°C保存会导致甲酰胺的降解。电导率高于100µS/cm的甲酰胺含有离子,在电泳进样时与DNA在发生竞争,这样会使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间不能增加信号强度。

①
 注意: 甲酰胺为刺激性的致畸胎剂,应避免吸入以及直接接触皮肤。当操作



此类试剂时,请仔细阅读警告标签,并请戴手套并佩戴防护眼镜。

样本准备

按照以下组分混合内标(ILS 600)和Hi-Di[™]甲酰胺,制备上样缓冲液:
 [(0.5µl ILS 600)×(电泳样本量)]+[(9.5µl Hi-Di[™]甲酰胺)×(电泳样本量)]
 注意:可以通过增加或减少上样缓冲液中内标(ILS 600)的加入量,来调整标准峰值的高度。ILS中100bp片段的理想峰值高度为500~1000 RFU。如果峰值过低,我们建议改变甲酰胺/ISL的混合体积为:9.0µl甲酰胺中加入1.0µl
 ILS 600;如果峰值过高,我们建议改变甲酰胺/ILS 600的混合体积为:9.75µl
 甲酰胺中加入0.25µl ILS 600。

2. 漩涡振荡10~15s混匀。

- 3. 在每孔中加入10µ甲酰胺/ILS混合缓冲液。
- 4. 加入1µI扩增产物(或1µI等位基因Ladder混合物)。用隔片将孔板覆盖。

注意:不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异,因此需要适当调节进样时 间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在"数据收集"软件中,使用"Module Manager"中的"run module"来设置进样时间和电泳电压。如果图谱的峰值高 于预想值,可以用Gold ST★R 1×Buffer预先稀释扩增产物,然后再与上样缓 冲液混合。否则会引起位点间峰值高度的不均衡。为了得到更好的结果,可 以在扩增反应时减少模板DNA的量,或将热循环的循环数减少2~4个循环。

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

仪器准备



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

使用2.0版本 (version 2.0) 数据收集软件进行样品分析时,按照ABI PRISM[®] 3100 或3100-Avant及3130或3130x/型遗传分析仪的用户操作手册,进行如下改动:

 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 认进样时间为5 seconds、进样电压为3kV,将电泳时间延长为2000 seconds。为您这套新的运行模式命名,然后点击"OK"。

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

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

注意:如果希望对样本数据进行自动分析,请参照仪器的用户使用说明书。

 在GeneMapper[®]平板记录中输入相应的样本信息,向右拉动滚动条,在 Results group 1栏目中选择期望进行结果分析的组,在Instrument



Protocol 1栏目中选择在步骤2中创建的新程序。确认所有样本的栏目中都 包含了这些信息。点击OK。

注意:在results group栏目的下拉菜单中点击New,可以创建一个新的结果分析组,选择General tab,输入组名,选择Analysis tab,然后在Analysis type 下拉菜单中选择GeneMapper-Generic。

- 5. 将样品板放入仪器,关上仪器门。
- 6. 在spectral viewer界面中,确认激活dye set F,并且对dye set F进行了正确地激活校正。
- 在运行程序列表中,选中在步骤3、4中创建的样品板记录,并且单击使其 变亮。
- 8. 一旦样品板记录被选中,点击与样品板中所加样本相对应的样品板图表。
- 9. 当样品板记录与样品板连接后,样品板图表将从黄色变成绿色,并且绿色的Run Instrument的箭头按钮被激活。
- 10. 点击工具栏中绿色的Run Instrument的箭头按钮,样品开始电泳。
- 11. 通过观察运行状态、阵列以及收集软件中的毛细管视窗来控制电泳。每次 电泳用时约45分钟。

V.B. 用Version 1.0.1 or 1.1数据收集软件,使用ABI PRISM[®] 3100遗传分析仪检测扩增片段

用户准备的材料

- 95°C加热模块、水浴装置或热循环仪
- 碎冰和冰水混合物
- 防回吸吸头
- 3100毛细管矩阵, 36cm



- 用于3100 Performance Optimized Polymer 4 (POP-4[™])
- 含 EDTA 的 10×遗传分析仪缓冲液
- 3100 专用 MicroAmp[®]透光 96 孔板和胶盖
- Hi-Di[™]甲酰胺(Applied Biosystems, Cat.# 4311320)
- PowerPlex[®] Matrix Standards, 3100/3130 (Cat.# DG4650)

⑦甲酰胺的质量对试验很重要,应使用电导率小于100µS/cm的Hi-Di[™]甲酰胺。甲酰胺应分装置于-20°C冻存,反复冻融或长时间的置于4°C保存会导致甲酰胺的降解。电导率高于100µS/cm的甲酰胺含有离子,在电泳进样时与DNA在发生竞争,这样会使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间不能增加信号强度。

 ① 注意: 甲酰胺为刺激性的致畸胎剂,应避免吸入及直接接触皮肤。当操作此

 类试剂时,请仔细阅读警告标签,并请戴手套并佩戴防护眼镜。

样本准备

按照以下组分混合内标(ILS)和Hi-Di[™]甲酰胺,制备上样缓冲液:
 [(0.5µl ILS 600) × (电泳样本量)] + [(9.5µl Hi-Di[™]甲酰胺) × (电泳样本量)]

注意:可以通过增加或减少上样缓冲液中内标(ILS)的加入量,来调整标准 峰值的高度。ILS中100bp片段的理想峰值高度为500~1000 RFU。如果峰值 过低,我们建议改变甲酰胺/ISL的混合体积为: 9.0µl甲酰胺中加入1.0µl ILS 600;如果峰值过高,我们建议改变甲酰胺/ILS 600的混合体积为: 9.75µl甲 酰胺中加入0.25µl ILS 600。

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

注意:不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异,因此需要适当调节进样时 间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在"数据收集"软件中,使用"Module Manager"中的"run module"来设置进样时间和电泳电压。如果图谱的峰值高 于预想值,可以用Gold ST★R 1×Buffer预先稀释扩增产物,然后再与上样缓 冲液混合。否则会引起位点间峰值高度的不均衡。为了得到更好的结果,可 以在扩增反应时减少模板DNA的量,或将热循环的循环数减少2~4个循环。

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

仪器准备

参照ABI PRISM[®] 3100型遗传分析仪的"用户操作说明"进行托板和毛细管矩阵的 清洗和安装,并进行空间校正及灌胶。

- 1. 打开ABI PRISM[®] 3100数据收集软件。
- 2. 将GeneScan36_POP4DefaultModule模式的电泳时间改为2000秒。
- 3. 将进样电压改为3 kV。
- 4. 将进样时间改为11秒。

注意:由于不同实验室仪器的检测灵敏度存在差异,Module Manage中的进



样时间和进样电压需要做相应调整。我们建议,进样时间的范围在3~22秒内, 进样电压的范围在1~3kV内。

- 将此运行模式以新名称保存(例如, GeneScan36_POP4PowerPlex16_3kV_11secs_2000),并最为所有运 行程序的初始模式。
- 创建一个新的平板记录并命名,选择GeneScan,选择相应的平板型号(例如,96-well),点击Finish。
- 完成加样孔相应的平板记录表。在sample name和color info栏目中键入相应的信息。对于等位基因ladder,在四色(蓝、黄、绿和红)的color info 一栏中都要键入"ladder"字样。为了能顺利的使用PowerTyper-16 Macro 软件(2.0版本)进行数据分析,必须正确的输入这些信息。
- 8. 在BioLIMS Project栏目的下拉菜单中选择3100_Project1。
- 9. 在Dye Set栏目的下拉菜单中选择Z。
- **10**. 如果您使用ABI PRISM[®] 3100数据收集软件,版本1.0.1或1.1,在Run Module 1栏目的下拉菜单中选择

GeneScan36_POP4PowerPlex16_3kV_11secs_2000。

- 如果收集数据时不进行自动分析,则在Analysis Module 1栏目中选择No Selection。完成数据收集后,使用GeneScan[®]分析软件分析数据的过程 中,可以进行适当的分析参数设置。
- 12. 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检测 样品板记录表中。
- 13. 将样品板放入仪器,并关上仪器门。
- 14. 在样品板记录表中,单击刚刚创建的待检测样品板记录。
- 一旦待检测样品板记录被选中,点击与样品板中所加样本相对应的样品板
 图表,使样品板与样品板记录表连接。
- 16. 当样品板记录与样品板连接后,样品板图表将从黄色变为绿色,样品板记

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09)
 CTMD012



录会从样品板记录列表中移至连接的样品板记录列表中,并且激活Run Instrument按键。

- 17. 在工具栏中点击Run Instrument按键,样品开始电泳。
- 18. 通过观察收集软件中的运行状态、矩阵状态及毛细管视窗来监控电泳。每次电泳时间约45分钟。

V.C. 使用ABI PRISM[®] 310遗传分析仪检测扩增片段

需用户准备的材料

- 95°C加热模块、水浴装置或热循环仪
- 310毛细管矩阵, 47cm × 50µm
- Performance Optimized Polymer 4 (POP-4[™])
- 玻璃注射器(1ml)
- 含 EDTA 的 10×遗传分析仪缓冲液
- 样品管及胶盖
- 防回吸吸头
- Hi-Di[™]甲酰胺(Applied Biosystems, Cat.# 4311320)
- PowerPlex[®] Matrix Standards, 310 (Cat.# DG4640)
- 碎冰或冰水混合物

甲酰胺的质量对试验很重要,使用电导率小于100µS/cm的Hi-Di[™]甲酰胺。甲酰胺 应分装置于-20°C冻存,反复冻融或长时间的置于4°C保存会导致甲酰胺的降解。 电导率高于100µS/cm的甲酰胺含有离子,在电泳进样时与DNA在发生竞争,这样 会使电泳图谱峰值减低并降低检测灵敏度。延长进样时间不能增加信号强度。

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

样本准备

按照以下组分混合内标(ILS)和Hi-Di[™]甲酰胺,制备上样缓冲液:
 [(1µl ILS 600) × (电泳样本量)] + [(24µl Hi-Di[™]甲酰胺) × (电泳样本量)]

注意:可以通过增加或减少上样缓冲液中内标(ILS)的加入量,来调整标准峰值的高度。ILS中100bp片段的理想峰值高度为500~1000 RFU。如果峰值过高,我们建议改变甲酰胺/ILS 600的混合体积为: 24.5µI甲酰胺中加入0.5µI ILS 600。

- 2. 漩涡振荡10~15s混匀。
- 3. 将25µl甲酰胺/ILS混合缓冲液与1µl扩增产物混合。

注意:不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异,因此需要适当调节进样时 间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。如果图谱的峰值高于预想值,可以 用Gold ST★R 1×Buffer预先稀释扩增产物,然后再与上样缓冲液混合。否则 会引起位点间峰值高度的不均衡。为了得到更好的结果,可以在扩增反应时 减少模板DNA的量,或将热循环的循环数减少2~4个循环(例如,10/18或 10/20循环)。

- 4. 将25µl甲酰胺/ILS混合缓冲液与1µl PowerPlex[®] 16等位基因Ladder混合。
- 5. 必要时略微离心进样板,以消除气泡。
- 将样本置于95°C变性3分钟,立即放在冰上冷却3分钟,之后尽快在遗传 分析仪上进行电泳。
- 7. 将样品管置于合适的自动进样托盘上(48或96管)。
- 8. 将自动进样托盘置于仪器内,关上仪器门。

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012

仪器准备

参照遗传分析仪的"用户操作说明"进行泵清洗、安装毛细管矩阵、校准自动进样托 盘及灌胶。

- 1. 打开ABI PRISM[®] 310数据收集软件。
- 参照ABI PRISM[®] 310型遗传分析仪用户操作手册准备GeneScan[®]样品表。在sample info栏目中输入相应的样品信息。
 在PowerPlex[®] 16等位基因Ladder一项的四色(蓝、黄、绿、红) sample info栏目中都要输入"ladder"一词,正确的输入这些信息可是确保顺利的使用PowerTyper-16 Macro软件(2.0版本)对数据进行分析。
- 3. 创建一个新的电泳进样清单。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3秒、电 泳时间改为30分钟,其余的参数设置如下:

Inj. Secs:	3
lnj. kV:	15.0
Run kV:	15.0
Run °C:	60
Run Time:	30

● 由于不同实验室仪器的检测灵敏度存在差异,进样时间需要做相应调整。当含有的模板DNA的量为1ng,我们建议进样时间的范围在2~5秒。

注意: ABI PRISM[®] 310型遗传分析仪在进行长时间电泳后,由于毛细管温度 或者其他方面的变化,电泳时片段的迁移率会发生微小的变化。当分析多个 样本时,在电泳的不同时间加入等位基因ladder有助于提高样本基因分型的 准确性。

- 5. 选择适当的Matrix文件(参见III.B,见6页)。
- 6. 选择"auto analyze"及设置适当的分析参数、片段大小标准,可以对数据 进行自动分析。参照ABI PRISM[®] 310型遗传分析仪用户操作手册,可以 获得进一步信息。
- 7. 装载样品板,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40分钟。

V.D. 使用ABI PRISM[®] 377 DNA测序仪检测扩增片段

需用户准备的材料

(溶液组分列于章节IX.H.)

- Long Ranger[®]凝胶液(Cambrex, Cat.# 50611) 或用于ABI 377-36cm的 • Long Ranger Singel[®] pack (Cambrex, Cat.# 50691) 。
- 10%过硫酸铵(Cat.# V3131)。
- **TEMED**。
- 尿素(Cat.# V3171)。
- TBE 10×buffer 缓冲液。
- Nalgene[®] 组织培养滤过器(0.2微米)。
- 36cm 前后玻璃板。
- 36cm 凝胶垫片(0.2mm 厚)。
- 36-孔鲨鱼齿梳或34-孔方齿梳(0.2mm厚)。
- 夹子(例如,大的办公室夹子)。
- 凝胶上样吸头。
- 防回吸吸头(参照IX.I.)。
- Liqui-Nox[®]或其他清洁剂。



- PowerPlex[®] Matrix Standards, 310 (Cat.# DG4640)
- Blue Dextran Loading Solution (Cat.# DV4351) 。
- 碎冰或冰水混合物
- 95°C加热模块、水浴箱或热循环仪。

注意:丙烯酰胺(Long Ranger[®]凝胶液)有神经毒性和致癌作用,应避免吸入及 直接接触皮肤。操作前应仔细阅读警示标签并做好防护措施,操作时应佩戴手套 及防护眼镜。

制备丙烯酰胺凝胶

以下介绍在ABI PRISM[®] 377 DNA测序仪上进行36cm变性聚丙烯酰胺凝胶电 泳准备工作的操作流程。我们推荐使用低荧光玻璃板,其可以从仪器供应商处获 得。

- 使用热水和1% Liqui-Nox[®]溶液彻底清洗玻璃板,然后用去离子水彻底冲洗,并将玻璃板置于无尘埃环境中空气干燥。
- 将0.2mm厚的凝胶垫片置于前后玻璃板中间,用夹子(每边4个)将前后 玻璃板固定。将安装好的玻璃板水平放在试管架或类似的支撑物上。
- 3. 参照Table 3所列的组分混合(总体积为50ml),制备5% Long Ranger[®] 丙烯酰胺凝胶。不断搅拌溶液直至尿素完全溶解。

Table 3. 制	备5%Long	Ranger	丙烯酰胺凝胶
------------	---------	--------	--------

成分	5%凝胶	终浓度
尿素	18g	6M
去离子纯净水	26ml	_
10×TBE	5ml	1×
50%Long Ranger [®] 凝胶溶液	5ml	5%

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012



50ml

注意:可能需用Long Ranger Singel[®] Pack。

- 将丙烯酰胺凝胶用0.2微米的滤膜(例如,Nalgene[®]组织培养滤过器)过 滤,并去气泡5分钟。
- 5. 向50ml的丙烯酰胺凝胶中加入35µl TEMED和250µl新配置的10%过硫酸 铵,并轻轻搅拌、混匀。
- 使用一次性60cc注射器将胶液由玻璃板底部小心灌入水平的玻璃板之间, 使凝胶注满至玻璃板顶部。灌注时为使凝胶持续注入,可以轻轻敲打玻璃 板,并防止产生气泡。
- 在玻璃板间插入36-孔鲨鱼齿梳或34-孔方齿梳。也可使用64-孔或96-孔鲨 鱼齿梳。
- 8. 使用3个夹子均匀固定齿梳。
- 9. 将剩余的丙烯酰胺溶液作为凝胶聚合反应的参照物。
- 凝胶聚合反应应持续2小时以上。检查凝胶聚合反应参照物,以确保聚合反应完全。
- **注意**:将胶板的顶端及底端用去离子水饱和的纸巾和塑料薄膜密封,以防止胶干 (尿素结晶会损坏胶),可使胶保存过夜。

仪器准备

- 1. 打开ABI PRISM[®] 377数据收集软件。
- 参照GeneScan[®]分析软件用户操作手册准备样品表。在sample info栏目 中输入相应的样品信息。
 在PowerPlex[®] 16等位基因Ladder一项的四色(蓝、黄、绿、红) sample info栏目中都要输入"ladder"一词,正确的输入这些信息可是确保顺利的使 用PowerTyper-16 Macro软件(2.0版本)对数据进行分析。
- 3. 按照下列设置,创建一个新的GeneScan[®]电泳模式:

Plate Check Module (平板检测模式):Plate Check APreRun Module (预电泳模式):PR GS 36A-2400Run Module (电泳模式):GS 36A-2400Collect time (收集时间):3 hoursWell-to-Read distance (读孔距离):36cm

- 4. 在下拉菜单中选择适当的样品表和齿梳类型。
- 5. 选择适当的凝胶Matrix文件(参见章节III.B,见9页)。

凝胶预电泳

- 从聚合的丙烯酰胺凝胶上取下夹子。必要时,用蘸有去离子水的纸巾擦净 玻璃板上溢出的丙烯酰胺。
- 刮除齿梳周围多余的丙烯酰胺并移去齿梳。如果使用鲨鱼齿梳,小心的将 梳齿插入胶中约1~2mm。
- 3. 将凝胶/玻璃平板装入377卡槽并固定。
- 4. 根据ABI PRISM® 377 DNA测序仪用户操作手册推荐的方式将卡槽在仪器中固定并检查平板,如果基线不水平,须移动卡槽,清洁平板表面,然后重新检查平板。
- 5. 在仪器顶端及底部的缓冲液槽中加入1×TBE缓冲液。
- 6. 使用60cc注射器注满缓冲液,并去除凝胶齿梳孔内的气泡,然后盖好顶端的缓冲液槽。用18-号针头的注射器除去凝胶底部的气泡。
- 装上加热板,接好水管,连接所有电极,关闭仪器门,点击PreRun开始 预电泳。将预电泳进行15~20分钟或电泳至凝胶温度升至40°C。通过状态 视窗可以监控凝胶温度。
- 8. 在凝胶预电泳期间,准备样品和等位基因ladder。

样品准备及上样

1. 按照以下组分混合内标(ILS 600)和Blue Dextran上样溶液,制备上样 缓冲液:

[(0.5µl ILS 600) × (电泳样本量)] + [(1.5µl Blue Dextran上样溶液) × (电泳 样本量)]

注意: 上样缓冲液中内标的体积可以根据标准片段峰值的高低进行调整。

- 2. 漩涡振荡10~15s混匀。
- 3. 将1.0µl扩增产物与2.0µl制备好的上样缓冲液混合。

注意:不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异,因此需要适当调节进样时 间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。如果图谱的峰值高于预想值,可以 用Gold ST★R 1×Buffer预先稀释扩增产物,然后再与上样缓冲液混合。否则 会引起位点间峰值高度的不均衡。为了得到更好的结果,可以在扩增反应时 减少模板DNA的量,或将热循环的循环数减少2~4个循环(例如,10/18或 10/20循环)。

- 将1.0μl PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder与2.0μl制备好的上样缓冲液混合。
 混合前将Allelic Ladder混合液充分振荡混匀。
- 5. 将样本略微离心,使管中的全部成分聚于管底。
- 6. 将样本95°C变性3分钟,然后迅速置于冰上冷却,变性后的样本尽快上样。
- 7. 15~20分钟的预电泳后,点击Pause键暂停仪器。在上样期间,水会持续 循环以保持凝胶的温度。
- 8. 使用充满缓冲液的带有18-号针头的60cc注射器冲去加样孔内的尿素。
- 9. 在每孔内上样1.5µl变性的样本。



● 不同的仪器,需要对上样体积进行优化,我们推荐上样体积为1.0~2.0µl。
10.将顶部缓冲液槽加盖,关闭仪器门。

凝胶电泳及检测

- 上样结束后,点击Cancel,结束预电泳。确证将电泳时间(run time)设置为3小时,点击Run开始电泳。
- 2. 通过观察凝胶图像和状态视窗,可以监控电泳。
- 3. 电泳3小时后,600bp的内标片段通过扫描窗。
- 4. 追踪、提取胶道。

玻璃平板的重新使用

分开玻璃平板,弃去凝胶。使用热水和1% Liqui-Nox[®]清洁剂彻底清洁玻璃平板,然后用去离子水冲洗玻璃板,最后将平板空气干燥。在此过程中不要划伤玻璃板。

注意:残留的肥皂和油污会引起鼓胶或背景不洁。可将玻璃板置于2N HCI中浸泡 15分钟,之后彻底清洗。

VI. 数据分析

VI.A. GeneMapper[®] ID (3.2版本) PowerPlex[®] Panel和Bin的设置

为了便于对由PowerPlex[®] 16 System得到的数据进行分析,我们创建了可以 使用GeneMapper[®] *ID*软件(3.2版本)进行自动基因分型的Panel和Bin文件。对 于使用GeneMapper[®] *ID*软件(3.2版本)的用户,我们建议全面阅读*Applied Biosystems GeneMapper[®] ID Software Human Identification Analysis Tutorial*,



熟悉软件的正规操作。对于使用GeneMapper[®] ID软件(3.1版本)的用户,我们 建议将软件升级至3.2版本。

预先准备

- GeneMapper[®] *ID*的用户可以从Promega公司网址:
 <u>www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/</u>获得相应的Panel和 Bin文件。
- 2. 输入您的联系信息,选择GeneMapper ID version 3.2,点击Submit。
- 3. 点击链接PowerPlex® Panels & Bin Sets,将.zip文件保存在电脑中。
- 4. 使用Windows[®] WinZip程序打开文件,将解压缩后的文件存入电脑相应的 位置。

导入Panel和Bin文件

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

- 1. 打开GeneMapper ID软件,版本3.2。
- 2. 打开Tool中的Panel Manager。
- 3. 点亮左侧板块上方(导向窗格)的Panel Manager图标。
- 4. 打开File中的Import Panels。
- 5. 遵循指令保存Panel和Bin文件。选择Promega_Panels_ID3.2.X.txt.(其中X指Panel和Bin文件最新的版本号),点击Import。
- 6. 在导向窗格中,点亮刚导入的Promega_Panels_ID3.2.X文件夹。
- 7. 打开File中的Import Bin Set。
- 8. 遵循指令保存Panel和Bin文件。选择Promega_Bins_ID3.2.X.txt.,点击 Import。
- 9. 在Panel Manager视窗的底部,点击Apply,然后点击OK。Panel Manager 视窗会自动关闭。

VI.B. 创建使用GeneMapper[®] *ID*软件进行案件(Casework)数据分析的方法 这些指令说明应参照Applied Biosystem GeneMapper[®] *ID*软件使用指南,第 1~11页,配合使用。

- 1. 打开Tool中的GeneMapper Manager。
- 2. 点击Analysis Methods界面。
- 3. 点击New,会打开一个新的分析方法编辑对话框。
- 4. 选择HID,点击OK。

注意:如果您没有看到HID选项,表明您没有安装GeneMapper[®] *ID*软件。可以通过email: <u>Chinatech@promega.com</u> 与Promega技术服务部门取得联系,获得帮助信息。

- 5. 键入对此分析模式的命名,例如PowerPlex16 advanced。
- 6. 点击选择Allele界面(Figure 3)。



of the second second second	dalla.		
Tei	Tetra	Penta	Нека
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	3.26	2.75	0.0
0.0	4.76	5.75	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.0	0.0	0.0
	Tel 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0	Tei Tetua 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0	Tei Tetua Penta 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0

Figure 3. Allele界面。在Bin设置中选择Promega_Bins_ID3.2.X.txt,其中X指Bin文件最新的版本号。

- 在Bin设置中选择与PowerPlex System相对应的
 Promega_Bins_ID3.2.X.,其中X指Bin文件最新的版本号。
- 8. 确定选中Use marker-specific stutter ratio if available栏目。
- 在使用PowerPlex[®] 16 System时,参照Figure 2输入相应的数值,以适当的滤过Stutter峰。如果需要获得此项设置的用途及产生的影响,请参阅 Applied Biosystems用户手册中的Installation Procedures and New Features for GeneMapper ID Software 3.2。



注意:其中的一些设置是经过优化的,可能会与Applied Biosystems用户手册 中的推荐设置存在差异。

10. 点击选择Peak Detector界面。我们推荐使用Figure 3中的设置。

注意:分析片段可以选择"全片段分析 (full range)"或"部分片段分析 (partial range)"。当使用部分片段分析功能,根据电泳数据选择适当的分析片段:将 引物峰后第一个制定的内标峰前作为起点,并且通过内标的片段值可以确定 起点值。

0
Promega

Peak Detection Algorithm: Advanced	×
Analysis Full Range Full Ran	Peak Detection Peak Amplitude Thresholds: B: 100 R: 100 G: 100 O: 100 Y: 100 Min. Peak Half Width: 2 pt Polynomial Degree: 3 Peak Window Size: 15 pt Slope Threshold Peak Start: 0.0 Peak End: 0.0 Eactory Defaults

Figure 4. Peak Detector界面

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

12. 点击选择Quality Flags界面。也可以改变其中的设置。

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

13. 点击OK,保存设置修改。

创建标准片段(Creating a Size Standard)


- 1. 打开Tool中的GeneMapper Manager。
- 2. 点击选择Size Standard界面。
- 3. 点击New。
- 4. 选中Basic or Advanced (Figure 5)。选择的分析方法的模式必须与先前 创建的分析方法模式相匹配。点击OK。

Datic or Advanced		
Classic		
Oye:	Red V	
Analysis Method	Destautt	~
Salarit Sample		

Figure 5. Select Dye and Analysis Methed视窗

5. 在Size Standard Editor界面(Figure 6),输入相应的命名,例如ILS 600 advanced。



E-de-	scan	dard Editor		
Eine St.	and and	Description		
Name:			ILS 000 Advanced	
Descript	lan:			
Size Sta	ndard	Dys:	Red	
Size St.	andan	Table		
		Size in Basepairs		
	1	60.0	-	
	2	80.0		
	3	100.0		
	4	120.0	-4	
	5	140.0		
	8	160.0		
	7	190.0		
	0	200.0		
	9	225.0		
	10	250.0	-	

Figure 6. 标准片段编辑

- 6. 选择红色(Red)作为标准片段颜色。
- 7. 输入标准片段的标准值(参见章节IX.E(见72页), Figure 13)。
- 8. 点击OK。

案件(Casework)样本数据处理

1. 参照Applied Biosystems GeneMapper[®] ID Software Human



Identification Analysis Tutorial,向新的计划表(Project)导入样本文件。

- 在Sample Type栏目中,使用下拉菜单标明样本类型(Ladder、Sample、 Positive Control或Negative Control)。计划表中的每个文件必须包含一 个Ladder,以进行正确的分型分析。
- 3. 在Analysis Method栏目中,选择先前在章节"Creating a Casework Analysis Method"中创建的分析方法。
- 在Panel栏目中选择PowerPlex_16_ID3.2.X,其中X指Panel文件最新的版本号。在章节VI.A中导入此Panel设置。
- 5. 在Size Standard栏目中,选择先前在章节"Creating a Size Standard"中创 建的片段标准。
- 如果分析数据来自ABI PRISM[®] 310型遗传分析仪或ABI PRISM[®] 377
 DNA测序仪,须确保在Matrix栏目中选择适当的Matrix文件。
- 7. 点击Analyze(绿色箭头键),开始数据分析。

VI.C. 使用GeneMapper[®] ID软件创建数据库或进行亲子鉴定方法

- 1. 打开Tool中的GeneMapper Manager。
- 2. 点击Analysis Methods界面。
- 3. 点击New,会打开一个新的分析方法编辑对话框。
- 4. 选择HID,点击OK。

注意:如果您没有看到HID选项,表明您没有安装GeneMapper[®] *ID*软件。可以通过email: <u>Chinatech@promega.com</u> 与Promega技术服务部门取得联系,获得帮助信息。

- 5. 对此分析模式进行描述性的命名,例如PowerPlex16_20%filter。
- 6. 点击选择Allele界面。
- 7. 在Bin设置中选择与PowerPlex System相对应的



Promega_Bins_ID3.2.X.,其中X指Bin文件最新的版本号。

- 8. 确定选中Use marker-specific stutter ratio if available栏目。
- 在使用PowerPlex[®] 16 System时,参照Figure 7输入相应的数值,以适当 的滤过Stutter杂峰。如果需要获得此项设置的用途及产生的影响,请参阅 Applied Biosystems用户手册中的*Installation Procedures and New Features for GeneMapper* ID Software 3.2。

ta Penta	Нека
2 0.2	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
3.76	0.0
5 5.75	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
	Penta 0.2 0.0

Figure 7.	使用20%杂峰滤过设置的Allele界面。	选择Promega_	_Bins_ID3.2.X.txt,	其中X指
-----------	-----------------------	------------	--------------------	------

Bin文件最新的版本号

 普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012

创建标准片段(Creating a Size Standard)

- 1. 打开Tool中的GeneMapper Manager。
- 2. 点击选择Size Standard界面。
- 3. 点击New。
- 4. 选中Basic or Advanced (Figure 5)。选择的分析方法的模式必须与先前 创建的分析方法模式相匹配。点击OK。
- 5. 在Size Standard Editor界面(Figure 6),输入相应的命名,例如ILS 600 advanced。
- 6. 选择红色(Red)作为标准片段颜色。
- 7. 输入标准片段的标准值(参见章节IX.E, Figure 13(见72页))。
- 8. 点击OK。

数据库或亲子鉴定样本数据处理

- 参照 Applied Biosystems GeneMapper® ID Software Human Identification Analysis Tutorial,向新的计划表(Project)导入样本文件。
- 在Sample Type栏目中,使用下拉菜单标明样本类型(Ladder、Sample、 Positive Control或Negative Control)。计划表中的每个文件必须包含一 个Ladder,以进行正确的分型分析。
- 在Analysis Method栏目中,选择先前在章节"Creating a Databasing or Paternity Analysis Method"中创建的分析方法。
- 在Panel栏目中选择PowerPlex_16_ID3.2.X,其中X指Panel文件最新的版本号。在章节VI.A(见30页)中导入此Panel设置。
- 5. 在Size Standard栏目中,选择先前在章节"Creating a Size Standard"中创 建的片段标准。
- 6. 如果分析数据来自ABI PRISM[®] 310型遗传分析仪或ABI PRISM[®] 377



DNA测序仪,须确保在Matrix栏目中选择适当的Matrix文件。

7. 点击Analyze(绿色箭头键),开始数据分析。

VI.D. 使用GeneScan[®]软件和PC操作系统分析样本数据

- 1. 使用GeneScan[®]分析软件分析数据。
- 浏览一个或多个样本电泳的原始数据。点亮样本的文件名,在Sample菜 单中点击raw data。移动光标使十字标线落在引物峰右侧的基线上(第一 个红色内标标准峰之前),将屏幕左下侧显示的X轴数值记为分析参数中 的起始值。
- 3. 推荐的分析参数设置参见Figure 8。



and the second second second second second	A stardab
Analysis Range	Size Call Range
C Full Range	Full Bange
This Range (Data I)	Points) C This Range (Base Pairs)
Start 3200	Min: D
Stop: 10000	Mar: 1000
Data Processing	Size Calling Method
	C 2nd Order Least Squares
- Smooth Option	C 3rd Order Least Squares
C Links	C Cubic Spline Interpolation
CHenn	Contract Local Southern Method
· meany	C Global Southern Method
Peak Detection	Baselining
eak Amplitude Thresho	dz BaseLine Window Size
B: 100 Y: 1	500 E1 Pts
B. 100 1. 1	
G: 100 R: 1	100 Auto Analysis Only
<u>ا</u>	Size Standard
din. Peak Half Width:]	2 Ptr (None) V
clynomial Degree	þ
Peak Window Size	15 Pts
Slope Threshold for J	0.0
	0.0

Figure 8. 分析参数视窗分析范围的起点因仪器不同而不同,具体说明请参阅章节VI.D,步骤 2(见41页)

4. 分析参数会被保存在Params文件夹,大多数系统中,这个文件夹位于:

C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\Params

- 5. 将保存的分析参数应用于样本分析。
- 标记新的标准片段(size standard)。选择一个样本文件,点亮标准片段 (size standard)旁边的箭头,点击Define New,参照章节IX.E(见72)



页)中的Figure 13标注标准片段峰值。保存标准片段的Size Standards 文件夹位于: C:\AppliedBio\Shared\Analysis\Sizecaller\SizeStandards 7. 将标准片段文件应用于样本,进行样本文件分析。

如需获得进一步使用PowerTyper. 16 Macro(版本2.0)和GeneScan[®]软件的帮助信息,请参阅章节VI.F(见45页)。

注意:

- 如果峰值高度超出仪器的线性范围,由于仪器的饱和(例如上样量过 大),会产生人为的杂峰。同时会观察到一种颜色向另一种颜色的渗 透(拉升),另外饱和信号可能会以双峰(峰顶裂开)的形式出现。
- 如果峰高不在仪器检测的线性范围内,杂峰与实际等位基因峰高的比率会升高,给等位基因的分型及判读造成困难,也会影响各峰高的均衡性。
- 同一样本在不同仪器上检测得到的相对荧光单位可能不同。另外,不 同仪器对荧光相对检测效率的不同会影响颜色间的平衡性。

VI.E. 使用GeneScan[®]软件和Macintosh[®](苹果机)操作系统分析样本数据

- 1. 使用GeneScan[®]分析软件分析数据。
- 浏览一个或多个样本电泳的原始数据。点亮样本的文件名,在Sample菜 单中点击raw data。移动光标使十字标线落在引物峰右侧的基线上(第一 个红色内标标准峰之前),将屏幕左下侧显示的X轴数值记为分析参数中 的起始值。
- 3. 以下为推荐的分析参数设置:



Analysis Range	Start: Defined in Step 2 Stop: 10,000
Data Processing	Baseline: Checked Multicomponent: Checked Smooth Options: Light ¹
Peak Detection	Peak Amplitude Thresholds²: B: Y: G: R: Min. Peak Half Width: 2pts
Size Call Range	Min: 60 Max: 600
Size Calling Method	Local Southern Method
Split Peak Correction	None

¹平滑度选择由各实验室自行决定。如果使用heavy smoothing,偶尔会出现不能区分TH01 等位基因9.3和10位点。

²峰阈值(peak amplitude thresholds)是指软件可识别的最小峰高值。其由实验室自行决定, 一般为50~200 RFU。

- 4. 分析参数会被保存在Params文件夹。
- 5. 将保存的分析参数应用于样本分析。
- 标记新的标准片段(size standard)。选择一个样本文件,点亮标准片段 (size standard)旁边的箭头,点击Define New,参照章节IX.E中的Figure 13标注标准片段峰值。将标准片段保存于Size Standards文件夹。
- 7. 将标准片段文件应用于样本,进行样本文件分析。

如需获得进一步使用PowerTyper. 16 Macro(版本2.0)和GeneScan[®]软件的帮助信息,请参阅章节VI.F(见45页)。

如需获得有关使用GeneScan[®]分析软件的进一步信息,请参阅GeneScan[®] Analysis Software User.s Manual。

注意:

1. 如果峰值高度超出仪器的线性范围,由于仪器的饱和(例如上样量过

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012



大),会产生人为的杂峰。同时会观察到一种颜色向另一种颜色的渗透(拉升),另外饱和信号可能会以双峰(峰顶裂开)的形式出现。

- 如果峰高不在仪器检测的线性范围内,杂峰与实际等位基因峰高的比率会升高,给等位基因的分型及判读造成困难,也会影响各峰高的均衡性。
- 同一样本在不同仪器上检测得到的相对荧光单位可能不同。另外,不 同仪器对荧光相对检测效率的不同会影响颜色间的平衡性。

VI.F. 使用Genotyper[®]和PowerTyper[™] 16 Macro软件分析样本数据

为了便于对由PowerPlex[®] 16 System得到的数据进行分析,我们创建了可以 使用Genotyper[®]软件进行自动基因分型的文件。当样本使用PowerPlex[®] 16 System扩增后,使用ABI PRISM[®] 310或3100型遗传分析仪(使用1.0.1或1.1版本 数据收集软件),或ABI PRISM[®] 377 DNA测序仪进行检测,数据通过GeneScan[®] 分析软件分析后,将样本文件导入Genotyper[®]程序,并由PowerTyper[™] 16 Macro 软件(版本2.0)分析。

Promega公司提供PowerTyper[™] 16 Macro软件(版本2.0)。PowerTyper[™] 16 Macro软件(版本2.0)以PowerTyper[™] Macros CD-ROM(Cat#, DG3470) 的形式提供,也可登陆网站: <u>www.promega.com/geneticidtools/</u> 下载。

PowerTyper[™] 16 Macro软件(版本2.0)须与Macintosh[®] Genotyper[®] 2.5版 本及Windows NT[®] Genotyper[®] 3.6或更高版本软件配套使用,因此在使用 PowerTyper[™] 16 Macro软件(版本2.0)之前,需要在计算机上安装Genotyper[®] 软件。

需要确定在sample info(Macintosh[®]电脑)或color info(Windows NT[®]电脑) 栏目中得等位基因Ladder一栏含有"ladder"一词。Macro通过识别"ladder"来确认含 有等位基因Ladder的文件。可在导入PowerTyper[™] Macro后继续添加或修改 Sample info,点亮样本,在Views下拉菜单中选择show dye/lanes window。

- 在计算机硬盘上的指定区域从PowerTyper[™] Macros CD-ROM (Cat #, DG3470)转载或从Promega网站下载,安装PowerTyper[™] 16 Macro 2.0 版本。
- 打开Genotyper[®]软件及PowerTyper[™] 16 Macro 2.0 版本软件。有关 Genotyper[®]软件遇到的问题,请参阅Genotyper[®] Analysis Software User.s Manual。
- 3. 在主菜单File中点击Import,导入待分析的样本文件。分别输入蓝、黄、 绿、红四色。
- 注意:在Edit菜单下选择Set Preferences,可以选择导入的荧光颜色。
- 4. 双击Check ILS指令(图标位于窗口左下侧),将会有窗口显示红色荧光的内标情况(ILS 600)。向下滚动窗口,确认内标片段标记正确。如果必要的话,可以使用GeneScan[®]软件重新分析样本数据,重新标记内标片段。

注意:软件只使用一个等位基因Ladder来度量等位基因片段大小。Macro使用 输入的第一个等位基因Ladder对样本进行分型。

5. 对于案件样本(Casework),双击POWER指令。POWER指令可以识别 Ladder样本中的等位基因并且计算全部基因座。此过程需要几分钟,结束 后会打开显示等位基因Ladder(例如,Penta E, D18S51, D21S11, TH01 及D3S1358等)的窗口。

另外,对于数据库或亲子鉴定,双击POWER 20% Filter指令,其与标准的POWER指令相比具有更高的滤过阈值基准,可以省去对峰值标注的人工编辑过程。但POWER 20% Filter指令不可用于混合样本的分析。

一般来讲,等位基因Ladder包含了与已知位点等位基因长度相同的片段, 它们的片段大小及重复单位列于Table 5(章节IX.B(见65页))。通过



使用GeneScan[®]和Genotyper[®]分析软件将样本扩增片段与等位基因 Ladder和内标进行比较,从而达到分型的目的。当使用内标(ILS)计算 等位基因Ladder长度时,可能与表中所列数据有所差异,这是由于等位基 因Ladder与内标(ILS)序列不同而导致的电泳迁移差异所致。

 双击Allelic Ladders指令,窗口中会显示蓝色荧光标记(Fluorescein)的 等位基因Ladders(例如,Penta_E,D18S51,D21S11,TH01和 D3S1358),绿色荧光标记(JOE)的等位基因Ladders(例如,Penta_D, CSF1PO,D16S539,D7S820,D13S317和D5S818),绿色荧光标记 (JOE)的等位基因Ladders(例如,Penta_D,CSF1PO,D16S539, D7S820,D13S317和D5S818)及黄色荧光标记(TMR)的等位基因 Ladders(例如,FGA,TPOX,D8S1179,vWA和Amelogenin)。确认 等位基因Ladders标记全部正确。

注意:软件只使用一个等位基因Ladder来度量等位基因片段大小。Macro一般使用输入的第一个等位基因Ladder对样本进行分型。如果POWER指令运行2次,软件会使用第二个Ladder;如果POWER指令运行3次,软件会使用第三个Ladder,依此类推,直到计划表中所有的Ladder被使用。如果一个等位基因Ladder分析失败,或者如果在样本中出现许多Off-Ladder等位基因,则需要使用计划表中另外的等位基因Ladder,对样本进行重新分析。

- 7. 双击Display Fluorescein Data指令,展示全部样本的蓝色荧光标记峰,可 根据需要进行编辑。
- 8. 双击Display TMR Data指令,展示全部样本的黄色荧光标记峰,可根据需要进行编辑。
- 9. 双击Display JOE Data指令,展示全部样本的绿色荧光标记峰,可根据需要进行编辑。
- 10. 通过选择Power Table、Make Allele Table或Make CODIS Table指令,



来创建合适的表格,可以得到以下3种图表。其中,Power Table选项可以 允许每个样本有4个等位基因,还包括低峰信号和高峰信号;Allele Table 和CODIS Table选项每个基因座只包含2个等位基因,如果多于2个则会包 含最小的。Allele Table将每个基因座确定为一组(Categories)来显示不 同等位基因的数据,而CODIS表则以行的形式来显示。这些表格可以根据 实验室的需求而进行优化。如果需要保存桌面数据,在Table下拉菜单中 点亮Export to File,可以将文件以指定的文件名存入指定的位置。保存的 文件可以使用Microsoft[®] Excel进行浏览的分析。

PowerTable Format

Sample	Sample	Category	Peak	Peak	Peak	Peak	Over-	Low	Satura-	Edited	Edited
Info	Comment		1	2	3	4	flow	Signal	tion	Label	Row

Allele Table Format

Sample	Category							
Info	Allele 1	Allele 2						

CODIS Table Format

Sample Info	Category	Peak 1	Peak 2

11. 在File菜单中点击Save as,保存分析数据。



PowerTyper[™] Macro是Genotyper[®]中的软件,如果使用Save而非

Save as, 文件会被取代。

VI.G. 对照



- 1. 观察阴性对照结果。阴性对照结果中不应有扩增产物。
- 观察9947A阳性对照DNA结果。将对照DNA等位基因重复片段与特殊位点 的等位基因Ladder对比。预期的9947A DNA等位基因全部位点分型参见 Table 6(章节IX.B(见65页))。

VI.H. 结果

PowerPlex[®] 16 System 典型的结果图谱参见Figure 9。PowerPlex[®] 16 Allelic Ladder Mix结果参见Figure 10。



Figure 9. PowerPlex[®] 16 System

使用PowerPlex[®] 16 10×Primer Pair Mix扩增单一模板DNA(1.0ng)。将扩增产物与内标 ILS600混合,在Applied Biosystems3130型遗传分析仪上,使用3kV电压、5秒进样时间模式 进行电泳检测。电泳结果使用GeneMapper[®] ID软件(3.2版本)进行分析。

Panel A. 使用荧光素 (FL) 标记位点的电泳峰图: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51和



Penta E。Panel B. 使用JOE-标记位点的电泳峰图: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO和Penta D。Panel C. 使用TMR-标记位点的电泳峰图: Amelogenin, vWA, D8S1179, TPOX和FGA。Panel D. 内标 (ILS600) 60bp至500bp片段的电泳峰图。



Figure 10. PowerPlex[®] 16等位基因Ladder混合液。

在Applied Biosystems 3130型遗传分析仪上,使用3kV电压、5秒进样时间模式对PowerPlex[®] 16等位基因Ladder混合液进行电泳检测。电泳结果使用GeneMapper[®] ID软件(3.2版本)和 PowerPlex[®] 16的Panel和Bin文件进行分析。

Panel A. 荧光素 (FL) 标记的等位基因成分及全部等位基因分型。Panel B. JOE-标记的等位 基因成分及全部等位基因分型。Panel C. TMR-标记的等位基因成分及全部等位基因分型。

非特异峰和阴影带

阴影带是在STR分析中经常出现的扩增非特异产物,经测序证实其长度通常 比真实的等位基因短一个重复序列,偶尔,也会出现比真实的等位基因短两个重 复序列或者长一个重复序列。通常情况下,等位基因重复序列的重复次数越多,



出现阴影带的可能性就越大。对于同一个位点,引物对设计不同,产生的阴影带的形状和强度会有略微的差别。在PowerPlex[®] 16 System(9)产品确认报告中,对阴影带进行了确证。

除阴影带以外,在PowerPlex[®]16 System产品的位点中也可以观察到其他一些非特异产物峰。在一些位点中,例如D21S11,它的n.2和n+2的位置(分别比真 实等位基因少2个碱基和多2个碱基),会出现一些"低峰值产物"(Low-level products)。有些样本会在等位基因D7S820和D13S317之间及等位基因D3S1358 和TH01之间的未命名的区域出现低峰值非特异产物。有些时候,在JOE荧光通道中的270-271bp位置上会看到Ladder外的非特异产物(off-ladder artifact)。在比TPOX位点短8-26碱基的位置和比vWA位点短6-21碱基的位置,会观测到一个或多个与扩增不直接相关的额外峰。当扩增的峰值显著增强(信号水平高或模 板量大),或者甲酰胺、电泳聚合胶或毛细管质量不高,或者变性不完全时,会 出现这些额外峰。请参阅章节VII,获取更多有关如何减少非特异峰的信息。

在JOE荧光通道中D5S818区域,在114-120bp之间有时可以检测到一个低水平的非特异峰(Low-Level Artifact)。另外,这种低水平的非特异峰也可以在TMR荧光通道中142-144bp及400-405bp之间检测到。这些非特异峰不是模板相关峰,也可能在阴性对照以及低浓度产物分析中出现。延长进样时间或者提高电泳电压,有可能增加这些非特异峰的峰高度。

VII. 问题及解决方案

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

Chinatech@promega.com。

问题	原因	评论及推荐的解决措施
等位基因缺失或峰值过低	DNA模板不纯	
普洛麦格(北京)生物技术有限公司. 电话:010-58256268 传真:010-5825	北京市东城区北三环东路 36 号 6160 邮编 100013 <mark>ww</mark>	模板用量过少,这个原因非 . 环球贸易中心 B 座 907-909.
(3/09)		CTMD012

VII.A. 扩增与片段检测



	常罕见。由于提取程序及样
	本来源的差异,DNA样本中
	可能存在抑制物。
模板量不足	请使用推荐量的模板DNA。
模板量不足	在毛细管电泳分析时,可以
	通过减少进样量,进行低拷
	贝数量分析
	(Low-copy-number ,
	LCN),以减少竞争性带电
	粒子的干扰。这可通过进行
	扩增后纯化或除盐、使用低
	导电率的甲酰胺、减少
	ILS600的用量的方法达到。
	这些方法需要通过实验室内
	的认证。
酶活性不足	使用推荐量的AmpliTaq
	Gold [®] DNA聚合酶,查看试
	管上标注的保存期限。
扩增程序不正确	确认扩增程序的设置
盐浓度过高或PH值改	如果DNA模板保存在TE缓
变	冲液中或过高浓度的EDTA
	溶液中,则DNA模板溶液的
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积 的20%。DNA样本含有过多
	溶液中,则DNA模板溶液的体积不可超过总反应液体积的20%。DNA样本含有过多的K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ 或EDTA,
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积 的20%。DNA样本含有过多 的K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ 或EDTA, 会抑制PCR反应。PH值的改
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积 的20%。DNA样本含有过多 的K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ 或EDTA, 会抑制PCR反应。PH值的改 变,也会影响PCR反应。建
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积 的20%。DNA样本含有过多 的K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ 或EDTA, 会抑制PCR反应。PH值的改 变,也会影响PCR反应。建 议将DNA保存在TE ⁻⁴ 缓冲液
	溶液中,则DNA模板溶液的 体积不可超过总反应液体积 的20%。DNA样本含有过多 的K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺ 或EDTA, 会抑制PCR反应。PH值的改 变,也会影响PCR反应。建 议将DNA保存在TE ⁻⁴ 缓冲液 中(10mM Tris-HCL,

热循环仪, 平板或试

管问题

在章节IV.B(见13页)可查阅

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号. 势振为说是程序。__我们没有 电话: 010-58256268 传真: 010-58256160 邮编 100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012



		测试过其他品牌的反应管、
		反应板及热循环仪。必要的
		话, 需校正热循环仪的加热
		模块。
	引物浓度过低	使用推荐量的引物浓度。使
		用前,须将10×PowerPlex [®]
		16引物混合物在漩涡振荡
		器上混匀15秒。
	毛细管电泳进样差	
	(内标ILS600同样受	重新进样。检查注射器是否
	到影响)	泄漏,检查激光源。
	使用的甲酰胺质量差	当电泳时,应使用Hi-Di [™] 甲
		酰胺。
在一个或多个通道有额外的	混有另外一种模板	可能存在交叉污染。应使用
杂峰出现	DNA,或者存在先前	防回吸加样头,并且及时更
	的扩增产物	换手套。
	样本变性不完全	将样本按照推荐的时间充分
		变性,并且迅速置于碎冰上
		冷却,然后及时上样电泳。
	STR扩增的非特异峰	STR系统的PCR扩增通常
		会产生一些比等位基因短一
		个重复序列的、微弱的非特
		异峰。如果过量上样, 会产
		生较高的"阴影带"。
	STR扩增的非特异峰	STR系统的PCR扩增可能
		会产生一些比等位基因少一
		个碱基的非特异峰, 这是由
		于3'末端加A不完全造成的。
		在热循环完成后, 应确保
		60℃充分延伸30分钟。(章
		节IV.B(见13页))
	背景信号高	

减少上样量或减少进样时



	间。(章节V(见15页))
毛细管电泳(CE)相	微小的电压变化或尿素结晶
关的非特异产物(尖	通过激光光源时会导致"尖
刺峰)	刺峰"或意外峰。尖刺峰有时
	只在一种颜色内出现,但通
	常会在多个颜色内出现,这
	样会容易鉴别。如果出现可
	疑的尖刺峰, 需重新电泳确
	认。
CE相关的非特异产物	用于仪器的水或用于稀释
CE相关的非特异产物 (污染物)	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如
CE相关的非特异产物 (污染物)	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿
CE相关的非特异产物 (污染物)	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿 色荧光中产生非特异峰。使
CE相关的非特异产物 (污染物)	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿 色荧光中产生非特异峰。使 用高压灭菌水,更换小管,
CE相关的非特异产物 (污染物)	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿 色荧光中产生非特异峰。使 用高压灭菌水,更换小管, 清洗缓冲液容器。
CE相关的非特异产物 (污染物) DNA过量	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿 色荧光中产生非特异峰。使 用高压灭菌水,更换小管, 清洗缓冲液容器。 扩增时模板量超过2ng,会
CE相关的非特异产物 (污染物) DNA过量	用于仪器的水或用于稀释 10×遗传分析缓冲液的水如 果存在污染,会在蓝色和绿 色荧光中产生非特异峰。使 用高压灭菌水,更换小管, 清洗缓冲液容器。 扩增时模板量超过2ng,会 引起大量阴影带的产生。

当峰值过高或者应用于样本

DNA测序仪, 需要生成

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京	市东城区北三环	东路 36 号. 铅球贸易中心上细砂 / 多0 美 个 局
电话: 010-58256268 传真: 010-58256160	邮编 100013	www.mom就会产生拉升现象。
(3/09)	第 54 页	● 如果是ABI ^{CTMD012} PRISM [®]
		310遗传分析仪或377



		电泳。
		• 不同仪器的灵敏度存在
		差异, 需要优化进样及
		凝胶上样的条件。请参
		阅章节V(见15页)。
	将扩增后的样本长时	
	间的保存在甲酰胺	使用新鲜的甲酰胺重新制备
	中,会导致DNA降解	样本。
	CE聚合胶	CE聚合胶超过保质期,或者
		将聚合胶在室温放置时间超
		过一个星期。
	仪器维护	按照用户使用手册推荐的操
		作,每天或每周进行仪器的
		维护。
等位基因Ladder与样本不	等位基因Ladder与引	应确保等位基因Ladder与
相同	物对混合物不匹配	引物对混合物来自同一个试
		剂盒。
	缓冲液不匹配	在样本稀释时使用了错误的
		缓冲液。稀释样本时应使用
		Gold ST★R 1×Buffer。
	甲酰胺质量不高	当分析样本时, 仅使用
		Hi-Di [™] 甲酰胺。
	等位基因Ladder与样	应确保等位基因Ladder与
	本是否匹配	样本在同一台仪器进行电
		泳。
	毛细管电泳多次后,	这可能由于多次电泳后,毛
	会发生样本的轻度偏	细管柱温会发生改变。将等
	移	位基因Ladder和样本重新
		同时电泳进行片段长度的检
		测。
	笙台 其田Laddor由 泳	左后步由这由司句会夕众
	守位垄囚Lauuei电孙	任每次电孙中可包占多个



DNA过量	如果扩增的模板量大于1ng
	时,会引起小基因座的产量
	远远高于大基因座,即小基
	因座的优势扩增。减少模板
	量,或将扩增程序中的循环
	数减少2~4个循环(10/20
	或10/18循环),可改善基因
	座间的峰高平衡。
使用FTA [®] 卡纸	得到的结果与DNA过量时
	类似。将扩增程序中的循环
	数减少2~4个循环(10/20
	或10/18循环),可改善基因
	座间的峰高平衡。
DNA样本降解	DNA样本降解,大基因座产
	量减少。可将DNA重新纯
	化。
DNA模板量不足	使用推荐量的模板DNA。当
	扩增时模板量过低, 会产生
	随机效应。
反应混合物平衡问题	使用前应将10×Primer Pair
	Mix 和 Gold ST★R
	10×Buffer充分解冻,并振
	荡混匀15秒,振荡后
	10×Primer Pair Mix不要离
	心。定期校准热循环仪及加
	样器。在某些情况下, 使用
	59℃退火温度代替60℃可
	以改善平衡。
DNA模板不纯	案件现场的检材可能存在抑
	制物,会导致位点丢失或峰
	高不平衡。

峰高不平衡



VII.B. GeneMapper[®] ID 分析软件

问题	原因	评论及推荐的解决措施
等位基因未命名	GeneMapper [®] ID 分	当使用GeneMapper [®] ID软
	析软件	件分析样本时,分析参数和
		片段标准在分析类型
		(analysis type)中必须全
		部 标 注 "Basic or
		Advanced"。如果他们是不
		同的,就会产生错误信息
		(Figure 11) $_{\circ}$
	标注的ILS600片段数	确保ILS600至少有一个片
	量不够	段小于样本的最小基因座,
		并且至少有一个片段大于样
		本的最大基因座。
	电泳时间过短,ILS的	在电泳过程中,没有检测到
	大一些的片段未被仪	全部的已定义的ILS600片
	器收集。	段标准。
		• 使用样本中的内标标准
		片段创建新的片段标
		准。
		● 延长电泳时间,重新电
		泳样本。
Ladder外的等位基因座(OL	使用的等位基因	
峰现象)	Ladder与样本来源于	使用同时电泳的等位基因
	不同的电泳过程	Ladder重新分析样本。
	GeneMapper [®] ID 软	确保等位基因Ladder与样
	件要求从样本的同一	本在同一文件夹中。新建一
	文件夹中导入等位基	个Project程序,并且重新分
	因Ladder。	析。请参阅章节VI.B或VI.C。
	用于 STR 系统的	选择与扩增时使用的STR系
	Panel文件选择错误。	统相对应的Panel文件。



	等位基因Ladder	在样本类型一栏中, 对于等
		位基因Ladder没有标注为
		"Allelic Ladder"
	在分析方法一栏选择	
	了错误的分析模式	确保使用"HID"分析模式。
	没有正确的标注样本	需对样本中的长度片段标准
	中的内标片段	进行手动定义。
片段标准命名不正确	在章节VI.B(见23页)	
图12	中选择的部分区域的	在分析模式中调节数据起始
	数据起始点不正确	点,或者使用全片段分析。
	在改进模式的片段标	打开片段匹配编辑器, 点亮
	准中有额外峰	额外峰,选择"编辑(Edit)",
		然后点击"删除片段标记
		(delete size label)",最后
		选择"自动调节片段(auto
		adjust sizes) "。
	电泳时间过短,ILS的	在电泳过程中,没有检测到
	大一些的片段未被仪	全部的已定义的ILS600片
	器收集。	段标准。
		• 使用样本中的内标标准
		片段创建新的片段标
		准。
		● 延长电泳时间,重新电
		泳样本。
片段标准中的峰丢失	峰值低于阈值	在分析方法设置中,降低红
		色荧光通道的峰阈值。
	某些内标峰质量差	直接对样本定义片段标准,
		跳过这些峰。
错误信息"Either panel, size	片段标准与分析方法	
standard, or analysis	未在同一模式下	确保两个文件设置在同一个
method is invalid"	("Classic" 或 "Basic	模式下,要么"Classic",要
	or Advanced")	么"Basic or Advanced"。



基因座未命名,但是没有显	没有对样本选择	在"Panel"一栏中,选择与使
示错误信息	Panel	用的STR系统相同的Panel
		选项。
	没有选择片段标准	在"片段标准"一栏中,确保
		选择了相应的片段标准。
	片段标准定义错误,	重新定义片段标准, 仅包含
	或片段峰丢失	样本中出现峰的区域。过早
		的中止电泳分析或电泳时间
		过短都会引起Ladder的大
		片段丢失。这些会在分析时
		的片段质量处显示红色标
		记,并且将不会对基因座进
		行命名。
错误信息"Both the Bin Set	指向分析方法的Bin	在 GeneMapper [®] Manager
used in the Analysis	设置被删除	中选择Analysis Method一
Method and the Panel		栏,打开相应的分析方法。
must belong to the same		选中Alleles一栏,选择相应
Chemistry Kit"		的Bin设置。
	在分析方法的Alleles	
	一栏中选择了错误的	确保选用了相应的Bin设置,
	Bin设置	如Figure 3所示。
基线明显升高	仪器相关	• ABI PRISM [®] 3100 \sim
		3100-Avant型遗传分析
		仪、Applied Biosystems
		3130和3130x/型遗传分
		析仪光谱校正效果差。
		制作一个新的光谱校正
		文件, 然后重电泳样本。
		● ABI PRISM [®] 310型遗
		传分析仪的Matrix质量
		差。重新电泳,并优化
		Matrix。



	分析方法使用Classic	对样本使用Classic模式进
	Mode	行分析引起的基线噪音比在
		Basic or Advanced模式下
		要高很多。我们推荐分析方
		法和片段标准均在
		Advanced模式下。
在分析样本时,出现红色警	在ABI PRISM [®] 310型	
示,并且当数据显示时会出	遗传分析仪上电泳样	
现下面的错误信息"Some	本时,都没有应用	
selected sample(s) do not	Matrix,则无数据显	
contain analysis data.	苏。	使用GeneMapper [®] ID软件
Those sample(s) will not be		分析数据时需导入Matrix文
shown"		件,并且重新进行分析。
准备导入Panel和Bin文件	不同的Panel和Bin设	
时,显示错误信息"Unable to	置发生冲突。	
save panel data		
java.SQLEException		
ORA-00001: unique		Panel和Bin设置全部删除,
constraint (IFA.CKP_NNN)		从另外一种路径重新导入文
violated"		件。
等位基因Ladder中的峰被	GeneMapper [®] ID 软	GeneMapper [®] ID软件或微
标记在Ladder范围以外	件	卫星分析设置不能用来替代
		HID 分析设置。
		GeneMapper [®] 软件 与
		GeneMapper [®] ID软件使用
		的是不同的运算法则,并且
		GeneMapper [®] 软件无法使
		用等位基因Ladder来纠正
		片段长度的不同。Promega
		推荐使用GeneMapper [®] ID
		软件来分析PowerPlex [®] 反
		应。如果使用GeneMapper [®]
		ID软件,版本3.1或3.2,应



确保分析方法选择为HID方 法。可以通过查看 GeneMapper[®] Manager中 分析方法的General界面确 认这项设置。分析类型不能 更改。如果分析方法不是 HID,必需将其删除,然后 重新创建一个分析方法。

VII.C. PowerTyper[™] 16 Macro

问题	原因	评论及推荐的解决措施
无法打开计算机中的文件	未安装Genotyper [®] 软	确保安装 Genotyper [®] 2.5
	件	(Macintosh [®]) 或
		Genotyper [®] 3.6 (Windows
		NT [®])或更高版本的软件。
	Genotyper [®] 软件版本	PowerTyper [™] 16 Macro不
	不正确	能在Genotyper [®] 2.5之前的
		版本中运行。
	CD-ROM在运输中被	请联系技术服务部门,
	损坏	E-mail :
		Chinatech@promega.com。
	文件在下载或传输的	重新下载,或从CD-ROM上获
	过程中被损坏	得文件。
错误信息 "Could not	未识别到等位基因	确保在含有等位基因Ladder
complete the"Run	Ladder文件	混合物的通道信息栏
Macro"command because		(sample info或color infor)
no dye/lanes are selected"		标明了ladder一词。Macro通
		过识别ladder一词来确认样
		本文件中包含了等位基因
		Ladder。
	未输入四种荧光颜色	对于Genotyper [®] 2.5、3.6或



		更高版本的软件,在Edit下进
		行设置,优先输入蓝、绿、黄、
		红四种颜色。
错误信息 "Could not	等位基因Ladder中一	等位基因Ladder的最小峰值
complete the"Run	个或多个等位基因的	高度被定义为150RFU,如果
Macro"command because	峰值低于150RFU	低于此值,软件无法识别及定
the labeled peak could not		位。需使用更多的样本量或延
be found"		长进样时间以确保等位基因
		Ladder的峰值高于150RFU。
	Macro误将等位基因	
	Ladder样本中的CE	
	尖刺峰作为等位基因	将等位基因Ladder重新上样
	Ladder峰	电泳。
	GeneScan [®] 分析参	
	数中设定 "heavy	
	smoothing" 使 得	
	smoothing" 使 得 TH01 基因座 9.3/10	将 分 析 参 数 设 定 为 "light
	smoothing" 使 得 TH01 基 因 座 9.3/10 不能分开	将 分 析 参 数 设 定 为 "light smoothing"
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据	将分析参数设定为"light smoothing"
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper [™] 文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的 等位基因大小与在categories
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper [™] 文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的 等位基因大小与在categories 中列出的同一等位基因碱基
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper [™] 文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的 等位基因大小与在categories 中列出的同一等位基因碱基 对大小及范围相比较。如果需
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不 符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的 等位基因大小与在categories 中列出的同一等位基因碱基 对大小及范围相比较。如果需 要,将category中的起始范围
	smoothing"使得 TH01基因座9.3/10 不能分开 等位基因Ladder数据 与使用的 PowerTyper™文件 不匹配 等位基因阶梯中碱基 对大小与定义范围不 符	将分析参数设定为"light smoothing" 确保PowerTyper [™] Macro文 件与使用的等位基因Ladder 相匹配。 确保内标定义正确。重新定义 内标片段,然后使用 GeneScan软件重新分析样 本。将等位基因阶梯中最小的 等位基因大小与在categories 中列出的同一等位基因碱基 对大小及范围相比较。如果需 要,将category中的起始范围 增加6bp,然后以新名称保存



	等位基因Ladder峰值	缩短进样时间,减少Ladder
	过高, 使渗透杂峰被	用量,提高参数中等位基因
	标记为等位基因峰	Ladder的域值,重新分析样
		本。
等位基因表格或图像中所	Macro运行指令不正	应使用POWER或POWER
列数据不全	确	20% Filter的Macro选项。
	未输入四种荧光颜色	对于Genotyper [®] 2.5、3.6或
		更高版本的软件,在Edit下进
		行设置,优先输入蓝、绿、黄、
		红四种颜色。
Macro中的"Check ILS"无	未输入四种荧光颜色	对于Genotyper [®] 2.5、3.6或
图形显示		更高版本的软件,在Edit下进
		行设置,优先输入蓝、绿、黄、
		红四种颜色。
出现Ladder以外的峰	CE使用一段时间后,	这也许由于温度或CE发生了
	运行了多个样本,不	变化。在PowerTyper [™] 16
	同样本的迁移率会发	Macro中,版本2.0,在不同
	生微小变化	的时间进行Ladder的进样。使
		用新的毛细管,不要将Ladder
		第一个进样。
	由于内标定义错误,	确保内标定义正确。使用
	等位基因的碱基对大	GeneScan软件重新分析样
	小出现错误	本,然后重新定义内标片段。



Sample Information	
Sample File	CRE 1725 H08 2004-06-17.fee
Sample Origin Path	: G:\Private\Technical Service\GI
datal.genetical/CRE_	172h_H00_2004-06-17.fsa
Status Message	: Changed size standard from ils00500mdv to IL5600_Classic
File Source	: Disk media
Error Message	
Rectary.	 GilBrivatalTechnical Servical67
datalgeneticalCRE_	172h_H00_2004-06-17.fsa::Either Panel, Size Standard or
knalysis Method wa	a invalid.
Analysis Method wa	a invalid.

Figure 11. 当分析参数和片段标准使用不同的分析类型,在GeneMapper[®] ID软 件中出现的错误信息



Figure 12. GeneMapper[®] ID软件中,内标片段定义不正确

VIII. 参考文献(略)

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
 电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012



登陆www.promega.com/geneticidentity/,可获得更多的STR相关文献。

IX. 附录

IX.A. STR分型优势

与AMP-FLP和VNTR等分型方法相比, STR基因分型方法所扩增的产物长度 小得多(小于500bp),因此更易于降解的DNA模板分析。此外,STR分型适用于 多种快速纯化方法所纯化的DNA,而这些纯化方法所获得的DNA量往往不够作 Southern印迹分析。

Promega的STR 产物具有不连续的可分离的长度,可以用每个基因座的几个 或所有等位基因的相同长度的片段构建成等位基因阶梯(Allelic Ladder),肉眼观察 或利用仪器比对同一基因座的等位基因阶梯和扩增样品,可以快速和准确地确定 等位基因座。用PowerPlex[®] 16系统获得的结果可以数据格式保存并与数据库做直 接比对。人口分析不需要使用随机确认的人口数据固定库。

IX.B. PowerPlex[®] 16系统所含位点的优势

PowerPlex[®] 16系统所采用的基因座(Table 4和Table 5),能满足世界范围 主要权威机构的需要。美国联邦调查局(FBI)选择13个STR核心基因座的分型数 据输入到CODIS(联合DNA索引系统,即美国犯罪人员分型数据库)中。 PowerPlex[®] 16系统在单个扩增反应中包含所有CODIS核心基因座

PowerPlex[®] 16系统还包含两个新的低影子带、高多态性的5核苷酸重复基因 座,PentaE和PentaD。这些基因座的加入极大增加了系统的分辨能力,使 PowerPlex[®] 16系统在亲子鉴定案件中,具有足够的非父排除力。另外PentaE和 PentaD的极低影子带的特性,使它们成为法医案例中鉴定DNA混合样本的理想基 因座。最后PowerPlex[®] 16系统所包括的性别基因座可鉴定每个样品的性别,表6 给出了PowerPlex[®] 16系统常用的标准DNA模板的等位基因型。

仔细选择的STR基因座和引物可以避免或减少非特异带的产生,包括与Tag DNA聚合酶相关的非特异产物及末端核苷酸添加。影子带,有时称作"n-4带型","影 子带",或"阴影带",是由于DNA扩增中缺失了一次重复,或样品中DNA本身的改 变,或两种情况均有。观察到的假带的出现主要是由于基因座本身和DNA的重复。 序列。

末端核苷酸添加是由于 Tag DNA聚合酶以不依赖于模板的方式在扩增的 DNA 片段的3′末端加核苷酸,一般是腺苷酸,发生这一现象的频率取决于不同的引物序 列。因此有时能观察到比预计少一个碱基的假带(无末端添加)。将引物序列作 了修饰,并在扩增流程的最后一步,加入60℃延伸30分钟的步骤,可在推荐用量 的DNA模板上作必要的完全的末端核苷酸添加。

存在微变化等基因座(基因座间相差的长度不是重复次数所致)使等位基因 座的解释和确认变得复杂。这和高度多态性,趋向微变化以及突变率的增加相关。 FGA和D21S11显示了相对常见的微变化。由于不太确知的原因, 高度多态性的 PentaE基因座却不显示微变化(Table 5)。

Table 4. PowerPlex[®] 16系统位点特异性信息



STR Locus	Label	Chromosomal Location	GenBank® Locus and Locus Definition	Repeat Sequence¹ 5´→ 3´
Penta E	FL	15q	NA	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (23)
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA Complex (23)
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, human tyrosine hydroxylase gene	AATG (23)
D3S1358	FL	3p	NA	TCTA Complex
FGA	TMR	4q28	HUMFIBRA, human fibrinogen alpha chain gene	TTTC Complex (23)
TPOX	TMR	2p23-2pter	HUMTPOX, human thyroid peroxidase gene	AATG
D851179	TMR	8q	NA	TCTA Complex (23)
vWA	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31, human von Willebrand factor gene	TCTA Complex (23)
Amelogenin ²	TMR	Xp22.1-22.3 and Y	HUMAMEL, human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein	NA
Penta D	JOE	21q	NA	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO, human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	NA	GATA
D75820	JOE	7q11.21-22	NA	GATA
D13S317	JOE	13q22-q31	NA	TATC
D55818	JOE	5q23.3-32	NA	AGAT

¹ The August 1997 report (24,25) of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) states, .1) for STR loci within coding genes, the coding strand shall be used and the repeat sequence motif defined using the first possible 5' nucleotide of a repeat motif; and 2) for STR loci not associated with a coding gene, the first database entry or original literature description shall be used".

² Amelogenin is not an STR but displays a 106-base, X-specific band and a 112-base, Y-specific band. 9947A DNA (female) displays only the 106-base, X-specific band.

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine

FL = fluorescein

JOE = 6-carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-dimethoxyfluorescein

Table 5. PowerPlex[®] 16系统等位基因Ladder信息

		Size Range of Allelic	Dense (Nieselander of Allelia	Repeat Numbers of
STR Locus	Label	(bases)	Ladder Components	in Allelic Ladder ^{3,4}
Penta E	FL	379-474	5-24	20.3
D18S51	FL	290-366	8-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27	
D21511	FL	203–259	24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38	
TH01	FL	156-195	4-9, 9.3, 10-11, 13.3	
D3S1358	FL	115-147	12-20	
FGA	TMR	322-444	16-18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26-30, 31.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2	
TPOX	TMR	262-290	6-13	
D8S1179	TMR	203-247	7-18	
vWA	TMR	123-171	10-22	
Amelogenin ⁵	TMR	106, 112	Х, Ү	
Penta D	JOE	376-449	2.2, 3.2, 5, 7-17	
CSF1PO	JOE	321-357	6-15	
D16S539	JOE	264-304	5, 8-15	
D75820	JOE	215-247	6-14	
D13S317	JOE	176-208	7-15	
D55818	JOE	119-155	7–16	

¹ The length of each allele in the allelic ladder has been confirmed by sequence analyses.

² When using an internal lane standard, such as the Internal Lane Standard 600, the calculated sizes of allelic ladder components may differ from those listed. This occurs because different sequences in allelic ladder and ILS components may cause differences in migration. The dye label also affects migration of alleles.

³ The alleles listed are those with a frequency of >1/1000.

⁴ For a current list of microvariants, see the Variant Allele Report published at



the U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST) web site at: www.cstl.nist.gov/div831/strbase/

⁵ Amelogenin is not an STR but displays a 106-base, X-specific band and a 112-base, Y-specific band.

Table 6. PowerPlex [®] 16系统对	了见的标准DNA模板所测定的等位基因结果
---------------------------------------	----------------------

	Standard DNA Templates ¹		
STR Locus	K562 ²	9947A	99483
Penta E	14, 5	13, 12	11, 11
D18S51	16, 15	19, 15	18, 15
D21511	31, 30, 29	30, 30	30, 29
TH01	9.3, 9.3	9.3, 8	9.3, 6
D3S1358	16, 16	15, 14	17, 15
FGA	24, 21	24, 23	26, 24
TPOX	9, 8	8, 8	9, 8
D8S1179	12, 12	13, 13	13, 12
vWA	16, 16	18, 17	17, 17
Amelogenin	Х, Х	Х, Х	Х, Ү
Penta D	13, 9	12, 12	12, 8
CSF1PO	10, 9	12, 10	12, 11, 10
D16S539	12, 11	12, 11	11, 11
D75820	11, 9	11, 10	11, 11
D13S317	8, 8	11, 11	11, 11
D55818	12, 11	11, 11	13, 11

¹ Information on strains 9947A, 9948 and K562 is available online at:

locus.umdnj.edu/nigms/. Strain K562 is available from the American Type Culture Collection: **www.atcc.org** (Manassas, VA).

² Strain K562 displays three alleles at the D21S11 locus.

³ Strain 9948 displays three alleles at the CSF1PO locus. The peak height for allele 12 is much lower than those for alleles 10 and 11.

IX.C. 识别率

PowerPlex[®] 16系统扩增的15个STR基因座具有很强的鉴别能力。这些位点的



人类学统计及它们多样的多元结合数据列于Table 7-9。这些数据是由, The Bode Technology Group (Springfield, VA), 北卡罗来纳州现场调查局 (Raleigh, NC), Palm Beach郡长办公室(West Palm Beach, FL), Virginia Division of Forensic Science(Richmond, VA)和Charlotte/Mecklenburg警署实验室(NC)等部门协 助提供。这些数据综合分析了来自于美国一非洲裔、美国一高加索裔和美国一西 班牙裔的200份无关个体样本。对于美国一亚裔的分析数据,来自超过150份无关 个体样本。参考文献27~32提供了更多的有关STR位点的人类学数据。

Table 7列出不同人群中PowerPlex[®] 1.2及PowerPlex[®] 16系统的偶合机率。 其中PowerPlex[®] 16系统的偶合机率范围为1/1.83×10¹⁷(美国一高加索裔)至 1/1.41×10¹⁸(美国一非洲裔)。

在亲子鉴定中,计算父权指数(PI)是经常被用到的一种鉴定方法,是指给 出嫌疑父、母、子的基因型,计算支持存在父子关系的遗传几率的方法。Table 8 列出了不同人群中PowerPlex[®] 1.2和PowerPlex[®] 16系统的典型父权指数。在各个 人群中PowerPlex[®] 16系统提供的父权指数超出500000。在父权分析中还可选择 排除率进行计算,由Table 9可见,在受试人群中由PowerPlex[®] 16系统获得的排 除率数值超过0.999998。

Table 7. 不同人群中PowerPlex[®] 1.2及PowerPlex[®] 16系统的偶合机率



	Matching Probability			
STR System	African-American	Caucasian-American	Hispanic-American	Asian-American
PowerPlex [®] 1.2				
System (8 STR loci)	1 in 2.77 × 10 ⁸	1 in 1.15 × 10 ⁸	1 in 1.45 × 10 ⁸	1 in 1.32 × 10 ⁸
PowerPlex® 16				
System (15 STR loci)	1 in 1.41 × 1018	1 in 1.83 × 1017	1 in 2.93 × 1017	1 in 3.74 × 1017

Table 8. Typical Paternity Indices of the PowerPlex[®] 1.2 and 16 Systems in Various Populations.

	Typical Paternity Index			
STR System	African-American	Caucasian-American	Hispanic-American	Asian-American
PowerPlex® 1.2 System	497	262	318	471
PowerPlex® 16 System	2,510,000	1,520,000	522,000	4,110,000

Table 8. 不同人群中PowerPlex[®] 1.2和PowerPlex[®] 16系统的典型父权指数

	Power of Exclusion			
STR System	African-American	Caucasian-American	Hispanic-American	Asian-American
PowerPlex® 1.2 System	0.9982042	0.9968863	0.9973367	0.9981793
PowerPlex® 16 System	0.9999996	0.9999994	0.9999983	0.9999998

IX.D. DNA的提取及定量

DNA IQ[™] System (Cat.# DC6700) 是专门设计用于法医及亲子鉴定中DNA 样本的提取及定量。这项新技术使用磁性颗粒简便有效地制备来源于斑迹、血液、 溶液等用于STR分析的样本。使用DNA IQ[™] System树脂提取DNA,可消除案件 样本中经常遇到的PCR抑制物及污染物。当模板量大时,使用DNA IQ[™] System 可制备得到恒定量的DNA。此系统可用于从常规样本,如口腔拭子、血液、FTA[®] 纸上的斑迹中定量提取DNA。此外,还可从组织、性犯罪案件检材及其它载体的 斑迹中提取DNA, DNA IQ[™] System的提取效果已通过使用PowerPlex[®] 16检验得
到了证实。定购信息请参阅章节IX.I。

AluQuant[™] Human DNA Quantitation System (Cat# DC1010)亦可用于人 类DNA的定量,定购信息请参阅章节IX.I。

DNA IQ[™] System及AluQuant[™] Human DNA Quantitation System已在 Beckman Coulter Biomek[®] 2000实验室自动化工作平台得到应用。有关Beckman Coulter或替他自动工作站的信息可咨询Promega的当地分公司或经销商

(<u>www.promega.com/worldwide/</u>)或E-mail: <u>Chinatech@promega.com</u>。

IX.E. 内标ILS600

内标(ILS)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及600碱基对。这些片段用CXR标记,可以在PowerPlex[®]16扩增产物存在的情况下,以第4种颜色进行单独检测。ILS 600与样本同时用于每一条泳道或每一根毛细管,以提高应用PowerPlex[®]16系统分析的精确度。ILS 600的配制及使用方法请参阅章节V。





IX.F. PowerPlex[®] 16系统扩增混合体系的制备



Table 10提供了PCR扩增混合体系中各组分的用量。将单个反应的体积(µl) 乘以全部样本数,即可获得最终混合体系的总体积量(µl)。

Table 10. PowerPlex[®] 16系统扩增混合体系

PCR Master Mix Component	Volume Per Reaction	×	Number of Reactions	=	Final Volume (µl)
Gold ST★R 10X Buffer	2.5µ1	×		=	
PowerPlex® 16 10X Primer Pair Mix	2.5µ1	×		=	
AmpliTaq Gold® DNA polymerase ¹	0.8µ1 (4u)	×		=	
nuclease-free water ²	μ1	×		=	
Per tube		×		=	
template DNA volume ² (0.25–1ng)	up to 19.2µ1	×		=	
total reaction volume	25µ1	×		=	

1、假定AmpliTaq Gold[®] DNA聚合酶浓度为5u/µl。若酶的浓度发生变化,所用的酶体积必须 相应地调整。

2、反应混合液体积加上模板DNA的体积应等于25µl。

IX.G. 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳(可选用)

如果实验室中PCR为常规操作,此项程序可选择应用。在聚丙烯酰胺或毛细 管电泳之前,可采用琼脂糖凝胶电泳来快速确证扩增反应成功与否。

需用户准备的材料

(溶液成分可参阅章节IX.H.(见74页))

• TAE 1×缓冲液

- 琼脂糖
- 5×上样溶液
- 溴化已锭溶液, 0.5µg/ml。
- 在100ml 1×TAE缓冲液加2g琼脂糖,制备2%的琼脂糖凝胶(约150cm²),在容器上标出液面高度,之后在微波炉中加热至琼脂糖溶解。在加热过程中蒸发损失的体积用预先加热(60℃)的去离子水来弥补。
- 2、铺胶前将琼脂糖冷却至55℃,确保胶槽水平,将琼脂糖倒入槽中插入梳子,静 置20-30分钟。
- 3、将10µl扩增产物与2.5µl 5×上样溶液混合。
- 4、准备1升TAE 1×缓冲液,作为电泳缓冲液。
- 5、将胶及槽放在电泳盒中,倒入电泳缓冲液使之至少没过胶面0.65cm,轻轻移 去梳子。
- 6、将与5×上样缓冲液混合的样本上样(见Step 3)。
- 7、电压设定在5v/cm。电泳2小时。
- 8、电泳后,将胶在含有0.5µg/ml溴化乙锭的1×TAE缓冲液中染色,室温轻摇20 分钟,用去离子水代替溴化乙锭,让胶脱色20分钟。
- 9、用紫外透射仪在302nm处将胶照相。

注意:分析数据时有时会有等位基因之外的带,这是由于电泳为非变性琼脂糖凝 胶电泳,其唯一的目的是确证PCR反应的成功。

IX.H. 缓冲液及溶液组分

10%过硫酸铵

将0.05g过硫酸铵溶于500µl去离了水中。

普洛麦格(北京)生物技术有限公司.北京市东城区北三环东路 36 号.环球贸易中心 B 座 907-909.
电话:010-58256268 传真:010-58256160 邮编100013 www.promega.com.cn (3/09) CTMD012

Blue Dextran上样缓冲液

88.25%	甲酰胺		
15mg/ml	Blue Dextran		
4.1mM	EDTA (PH8.0)		

溴化已锭溶液(10µg/ml)

1.0g 溴化己锭

将溴化已锭溶于100ml去离了水中。用薄铝片包裹或转移至深色试剂瓶中室温保存。

注意: 溴化已锭为强诱变剂, 使用时必须佩戴手套, 称量时必须佩戴面具。

Gold ST★R 10X Buffer

500mM KCI 100mM Tris-HCI (pH 8.3 at 25°C) 15mM MgCI2 1% Triton® X-100 2mM each dNTP 1.6mg/ml BSA

TAE 50X buffer (pH 7.2)

242g Tris-碱

57.1ml 冰醋酸

100ml 0.5M EDTA存储液

将Tris-碱和EDTA溶于500ml灭菌水中,缓慢加入冰醋酸,用灭菌水补齐终体积1L。

TBE 10×缓冲液

107.8g Tris 碱

7.44g EDTA (Na₂EDTA·2H₂O)

~55.0g 硼酸

将Tris 碱和EDTA溶于800ml灭菌水中,缓慢加入硼酸并监测溶液的PH至期望值 8.3,然后用灭菌水补足溶液终体积至1升。

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

2.21g Tris 碱

0.037g EDTA (Na₂EDTA·2H₂O)

将Tris 碱和EDTA溶于900ml灭菌水中,用HCl调节PH至8.0,然后用灭菌水补足溶 液终体积至1升。

IX.I. 相关产品

荧光STR复合系统

Product	Size	Cat.#
PowerPlex® 16 Monoplex System, Penta E		
(Fluorescein)	100 reactions	DC6591
PowerPlex® 16 Monoplex System, Penta D (JOE)	100 reactions	DC6651
PowerPlex® ES Monoplex System, SE33 (JOE)	100 reactions	DC6751
PowerPlex [®] 1.2 System	100 reactions	DC6101
PowerPlex® 16 BIO System	100 reactions	DC6541
	400 reactions	DC6540
PowerPlex® ES System	100 reactions	DC6731
	400 reactions	DC6730
PowerPlex® Y System	50 reactions	DC6761
	200 reactions	DC6760

不用于医学诊断

配套组分

Product	Size	Cat.#
PowerPlex® Matrix Standards, 310*	50µl (each dye)	DG4640
PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130*	25µl (each dye)	DG4650
PowerTyper™ Macros*	1 CD-ROM	DG3470
Internal Lane Standard 600**	150µ1	DG2611
Gold ST★R 10X Buffer**	1.2ml	DM2411
Mineral Oil	12ml	DY1151
Nuclease-Free Water**	50ml (2 × 25ml)	P1193

*不用于医学诊断

**仅供实验室使用

样本制备产品

Product	Size	Cat.#
DNA IQ™ System**	100 reactions	DC6701
	400 reactions	DC6700
Differex™ System*	50 samples	DC6801
	200 samples	DC6800
Maxwell® 16 Instrument**	each	AS2000
DNA IQ™ Reference Sample Kit for Maxwell® 16***	48 preps	AS1040
DNA IQ™ Casework Sample Kit for Maxwell® 16***	48 preps	AS1210
Plexor® HY System*	800 reactions	DC1000
	200 reactions	DC1001
Slicprep™ 96 Device**	10 pack	V1391

*不用于医学诊断

**仅供实验室使用

***仅供研究使用,不得用于诊断程序

聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂



Product	Size	Cat.#
Ammonium Persulfate	25g	V3131
TBE Buffer, 10X	1L	V4251
Urea	1kg	V3171
Blue Dextran Loading Solution*	3ml	DV4351

仅供实验室使用

ART[®] Aerosol-Resistant Tips

Product	Volume	Size (tips/pack)	Cat.#
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0.5–10µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0.5–10µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20µ1	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200µ1	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1,000µl	800	DY1131



(a)STR loci are the subject of U.S. Pat. No. RE 37,984, German Pat. No. DE 38 34 636 C2 and other patents issued to the Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V., Germany. The development and use of STR loci are covered by U.S. Pat. No. 5,364,759, Australian Pat. No. 670231 and other pending patents assigned to Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Patents for the foundational PCR process, European Pat. Nos. 201,184 and 200,362, expired on March 28, 2006. In the U.S., the patents covering the foundational PCR process expired on March 29, 2005.

(b)U.S. Pat. Nos. 6,238,863 and 6,767,703 and Korean Pat. No. 691195 have been issued to Promega Corporation for materials and methods for identifying and analyzing intermediate tandem repeat DNA markers. Other patents are pending.

(c)U.S. Pat. Nos. 5,843,660, 6,479,235, 6,221,598 and 7,008,771, Australian Pat. No. 724531, Canadian Pat. No. 2,118,048, Korean Pat. No. 290332, Singapore Pat. No. 57050 and Japanese Pat. No. 3602142 have been issued to Promega Corporation for multiplex amplification of STR loci. Other patents are pending.

(d)The purchase of this product does not convey a license to use AmpliTaq Gold® DNA polymerase. You should purchase AmpliTaq Gold® DNA polymerase licensed for the forensic and human identity field directly from your authorized enzyme supplier.

© 2000–2008 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Maxwell, Plexor and PowerPlex are registered trademarks of Promega Corporation. Differex, DNA IQ, PowerTyper and Slicprep are trademarks of Promega Corporation.

ABI PRISM, GeneMapper, GeneScan, Genotyper and MicroAmp are registered trademarks of Applera Corporation. AmpliTaq Gold and GeneAmp are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc. ART is a registered trademark of Molecular Bio-Products, Inc. Biomek is a registered trademark of Beckman Coulter, Inc. Freedom EVO is a registered trademark of Tecan AG Corporation. FTA is a registered trademark of Flinders Technologies, Pty, Ltd., and is licensed to Whatman. GenBank is a registered trademark of the U.S. Dept. of Health and Human Services. Hi-Di and POP-4 are trademarks of Applera Corporation. Liqui-Nox is a registered trademark of Alconox, Inc. Long Ranger and Long Ranger Singel are registered trademarks of Cambrex Corporation. Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc. Microsoft, Windows and Windows NT are registered trademarks of Microsoft Corporation. Nalgene is a registered trademark of Nalge Nunc International. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Technology Corporation. Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.