

技术手册

Part# CTMD018

PowerPlex[®] Y System

DC6760和DC6761产品使用说明

原英文技术手册号码: TMD022

1. 介绍

STR（短串联重复序列）是由长度为 3-7 个碱基对的短串联重复序列组成的（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、银染和荧光检测可以区别不同的基因型。

位于 Y 染色体上的 **STR** 标记与常染色体上的标记不同，并且可以用于人身鉴定（9-15）。Y-STR 标记在 Y 染色体的非重组区域，并且在扩增男性 DNA 时生成单倍体图谱。本产品通过去除扩增图谱中的女性提供物来简化男女混合样品的分析过程。这些标记的精确父系遗传使它们可以用于亲子鉴定和亲缘关系分析的研究。

PowerPlex®Y 系统可以进行 12 个位点的复合扩增和三色检测。此系统的扩增位点包括：DYS19, DYS385a/b, DYS389 I / II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438 和 DYS439(18)。这些位点中，DYS389 I / II, DYS391, DYS439 的特异引物使用荧光素（FL）标记，DYS385a/b, DYS390, DYS393 的特异引物使用羟基-四甲基罗丹明（TMR）标记，DYS19, DYS392, DYS438 和 DYS437 的特异引物使用 6-羟基- 4',5'-二氯 -2',7'-二甲氧基-荧光素（JOE）标记。全部的 12 个位点在同一管中同时扩增，然后通过单一进样或单一胶道进行电泳分析。

PowerPlex®Y 系统适用于 ABI PRISM®310, 3100 和 3100-Avant 型遗传分析仪、Applied Biosystems 3130 和 3130xl 型遗传分析仪 ABI PRISM®377DNA 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实验。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实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®Y 系统提供除 AmpliTaqGold®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®Y** 系统的操作程序以及扩增产物、检测的操作流程（Figure1）。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：WWW.promega.com 或与 Promega 公司联系。

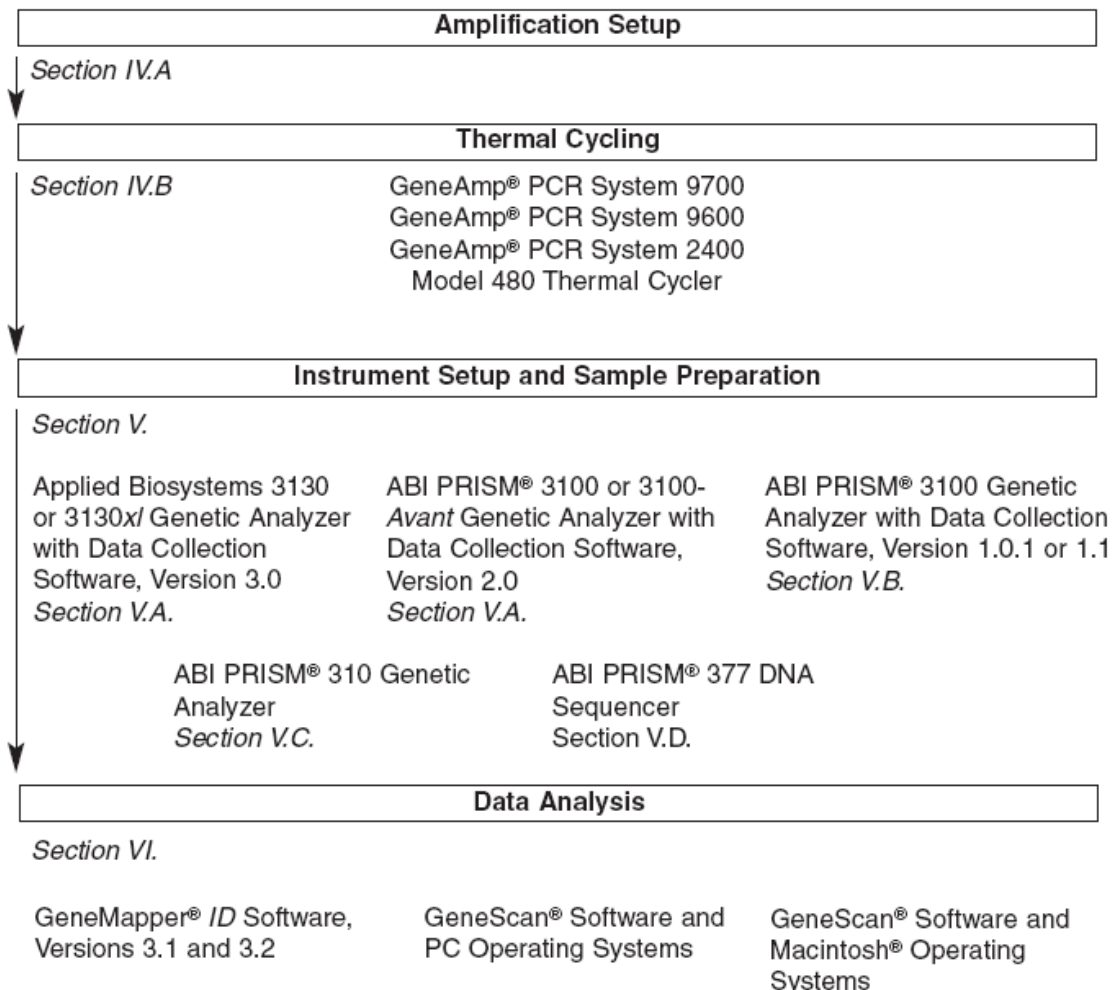


Figure1

II. 产品组份和储存条件

产品	规格	目录号
PowerPlex®Y system	50 个反应	DC6761

此产品不得用于医疗诊断。

Cat.# DC6761 提供的试剂，足够以 25µl 反应体系进行 50 次反应。其中包括：

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

(4/09)

CTMD018

扩增前试剂盒组份（蓝色管盖）

1x300µl Gold ST★R 10 x Buffer

1x125µl PowerPlex®Y 10 x Primer Pair Mix

25µl 9948 Male DNA(10ng/µl)

25µl 9947A DNA(10ng/µl)

扩增后试剂盒组份（米黄色盖）

1x 12.5µl PowerPlex®Y Allelic Ladder Mix

1x 150µl Internal Lane Standard (ILS) 600

1 技术手册

产品	规格	目录号
PowerPlex®Y system	200 个反应	DC6760

此产品不得用于医疗诊断。

Cat.# DC6760 提供的试剂，足够以 25µl 反应体系进行 200 次反应。其中包括：

扩增前试剂盒组份（蓝色管盖）

2x300µl Gold ST★R 10 x Buffer

4x125µl PowerPlex®Y 10 x Primer Pair Mix

25µl 9948 Male DNA(10ng/µl)

25µl 9947A DNA(10ng/µl)

扩增后试剂盒组份（米黄色盖）

4x 12.5µl PowerPlex ®Y Allelic Ladder Mix

2x 150µl Internal Lane Standard (ILS) 600

1 技术手册



PowerPlex ®Y 系统等位基因 ladder 混合物在运输过程中保存于隔离、密闭包装中。包装开启后应置于“扩增后”的盒中。

储存条件：所有组份要保存于-20冻存。**PowerPlex ®Y 10 x Primer Pair Mix**、**PowerPlex ®Y AllelicLadder Mix** 及**Internal Lane Standard (ILS) 600** 对光敏感，须避光保存。我们强烈推荐扩增前试剂与扩增后试剂要分开保存并使用不同的吸头，试管架等。

单独提供的产品

产品	规格	目录号
Blue Dextran Loading Solution*	3ml	DV4351
PowerTyper™ Macros(Release)**	1CD-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 ®Y 系统配合使用的 PowerTyper™ YMacro（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: www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/获得。

Matrix standard用于初始建立不同色的光谱矩阵文件,并可以针对不同的分析仪器型号单独购买。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3130x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.G。

III 实验前必读

III. A. 警示

此手册中未包含法庭及侵权案件中基于PCR的基因分型的应用需要有效性的研究及质量控制措施(19, 20)。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时,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®Y 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®Y 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.G)。

一些用于STR产物分析的试剂含有潜在的毒性作用,应按要求操作。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3130xI**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
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标准化或光谱校正

在ABI PRISM®310, 3100和3100-Avant型遗传分析仪和Applied Biosystems 3130、3130xI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、3130xI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[®] Y系统进行DNA扩增

用户准备的材料

- 微量离心机
- 热循环仪Thermal Cycler Model 480或GeneAmp[®] PCR System 9600, 9700或2400(Applied Biosystems)
- 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.G)
- 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25 μ l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[®] Y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。

男性和女性DNA的混合样品总量必须要超过1ng。即使在有女性DNA存在的情况下, 此系统只扩增来自于男性的单模标本。要得到可信的结果, DNA的总量以及男性和女性DNA的比例需要各自自己实验室的验证。在进行多个位点分析之前对性别位点进行扩增和分析, 这样可以提供一些关于男女DNA比例的信息。我们还

提供针对单一性别位点，标记有荧光素（Cat.#DC5171）或TMR(Cat.#DC6171)，的基因座扩增系统。

IV.A. 扩增体系的建立

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。



为确保扩增的成功，在扩增时需要特别小心，我们在章节VII.A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®Y 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0.2ml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.E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®Y系统扩增混合液

PCR反应混合液组分 ¹	一份样本所加体积
去核酸酶纯净水	将终体积补至25µl
Gold ST★R 10×Buffer	2.5µl
PowerPlex®Y 10×Primer Pair Mix	2.5µl
AmpliTaq Gold®DNA聚合酶 ²	0.55µl (2.75U)
DNA模板 (1ng) ³	19.45µl
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、PowerPlex®Y 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TE⁴缓冲液（10mM Tris HCl [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-HCl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），可改善位点间的平衡。

- 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9948 DNA，使其在加入与样本相同的体积中含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、**可选做：**9947A（女性）DNA可以用来做为阴性对照来证明男性的特异性。吸取适量DNA（必要的话可进行适当稀释）加入到装有PCR反应液的反应管中。
- 10、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反应液飞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®Y 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。

2、 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: 96°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 90°C for 30 seconds ramp 29% to 58°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 22 cycles, then: 60°C for 30 minutes 4°C soak	95°C for 11 minutes, then: 96°C for 1 minute, 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 100% to 58°C for 30 seconds ramp 23% to 70°C for 45 seconds for 22 cycles, then: 60°C for 30 minutes 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: 96°C for 1 minute, 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: 90°C for 30 seconds ramp 60 seconds to 58°C (hold for 30 seconds) ramp 50 seconds to 70°C (hold for 45 seconds) for 22 cycles, then: 60°C for 30 minutes 4°C soak	95°C for 11 minutes, then: 96°C for 2 minutes, then: 94°C for 1 minute 60°C for 1 minute 70°C for 1.5 minutes for 10 cycles, then: 90°C for 1 minute 58°C for 1 minute 70°C for 1.5 minutes for 22 cycles, then: 60°C for 30 minutes 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是在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。

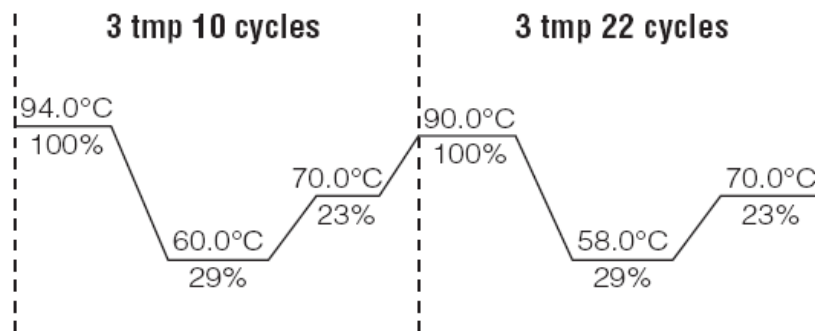


Figure 2. GeneAmp® PCR 9700 型热循环仪温度变化速率

V. 仪器设置及样品准备

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，应使用电导率小于100 μ S/cm的Hi-Di™甲酰胺。甲酰胺应分装置于-20℃冻存，反复冻融或长时间的置于4℃保存会导致甲酰胺的降解。电导率高于100 μ S/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强信号。



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，并请戴手套与佩戴防护眼镜。

样本准备

1. 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：[(0.5 μ l ILS 600) $\times$ (电泳样本量)] + [(9.5 μ l Hi-Di™甲酰胺) $\times$ (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，来调整内标峰值的高度。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/ILS的混合体积为：9.0 μ l甲酰胺中加入1.0 μ l 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：9.75 μ l甲酰胺中加入0.25 μ l ILS 600

2. 漩涡振荡10~15s混匀。

3. 在每孔中加入10 μ l甲酰胺/ILS混合缓冲液。

4. 加入1 μ l扩增产物（或1 μ l等位基因Ladder混合物）。用隔片将孔板覆盖。

5. 必要时略微离心进样板，以消除气泡。

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“Data Collection”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。

6. 将样本置于95℃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3130xl型遗传分析仪的用户操作手册，进行如下改动：

1. 在“Module Manager”中点击“New”。在“Type”下拉菜单中选择“Regular”，然后“Template”下拉菜单中选择“HIDFragmentAnalysis36_POP4”。确认进样时间为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1~3kV。

2. 在“Protocol Manager”中点击“New”，并为新程序命名。在“Type”下拉菜单中选择“Regular”，然后在“Run Module”下拉菜单中选择在上一步骤中创建的运行模式。最后，在“Dye-Set”中选择“F”（相应光谱校正使用的Dye set），点击OK。

3. 进入Plate Manager，参照仪器的用户使用说明书创建一个新的平板记录。在随后出现的对话框中的Application下拉菜单中选择GeneMapper-Generic或预先指定的选项，并且选择所用的平板类型（96-well），输入备注信息，点击OK。

注意：如果希望对样本数据进行自动分析，请参照仪器的用户使用说明书。

4. 在GeneMapper®平板记录中输入相应的样本信息，向右拉动滚动条，在Results group 1栏目中选择期望进行结果分析的组，在InstrumentProtocol 1栏目中选择在步骤2“Protocol Manager”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. 将样品板放在仪器上，关上仪器门。

6. 在spectral viewer界面中，确认激活dye set F或相应光谱校正使用的Dye set，并且对相应的dye set进行了正确地激活校正。

7. 在运行程序列表中，选中在步骤3、4中创建的样品板记录，并且单击使其变亮。

8. 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)



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℃冻存, 反复冻融或长时间的置于4℃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

1. 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 ILS600; 如果峰值

过高，我们建议改变甲酰胺/ILS 600的混合体积为：9.75 μ l甲酰胺中加入0.25 μ l ILS 600。

2. 漩涡振荡10~15s混匀。

3. 在每孔中加入10 μ l甲酰胺/ILS混合缓冲液。

4. 加入1 μ l扩增产物（或1 μ l等位基因Ladder混合物）。用隔片将孔板覆盖。

注意：不同实验室的仪器的检测灵敏度存在差异，因此需要适当调节进样时间或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在“Data Collection”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。

6. 将样本置于95℃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。

5. 将此运行模式以新名称保存（例如，

GeneScan36_POP4PowerPlexY_3kV_11secs_2000），并最为所有运行程序的初始模式。

6. 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**。
7. 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-Y 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_POP4PowerPlexY_3kV_11secs_2000。
11. 如果收集数据时不进行自动分析，则在**Analysis Module 1**栏目中选择**NoSelection**。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。
15. 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

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

1. 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：24.5μl甲酰胺中加入0.5μl 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®Y等位基因Ladder混合。

5. 必要时略微离心进样板，以消除气泡。

6. 将样本置于95℃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。

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。
2. 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®Y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-Y 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27分钟，其余的参数设置如下：

Inj. Secs: 2-5

Inj. kV: 15.0

Run kV: 15.0

Run °C: 60

Run Time: 27



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。等位基因ladder和样品的扩增数最好不超过32个，进样时间最长为5秒钟。应用高灵敏度仪器，扩增的男性模板量大于1ng时，循环数为32个，并缩短进样时间。

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）。

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.F.）

- 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。
- TBE 10×buffer 缓冲液。
- Nalgene®组织培养滤过滤器（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.G.）。
- 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。

1. 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。
2. 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

组份	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%
总体积	50 ml	

注意：可能需用Long Ranger Singel[®]Pack。

4. 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。
6. 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。
7. 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。
10. 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

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

（4/09）

www.promega.com.cn

CTMD018

1. 打开ABI PRISM[®]377数据收集软件。
2. 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[®]Y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-Y 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 A

PreRun Module（预电泳模式）： PR GS 36A-2400

Run Module（电泳模式）： GS 36A-2400

Collect time（收集时间）： 2.5 hours

Well-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）。

凝胶预电泳

1. 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。
2. 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。
7. 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：

$[(0.5\mu\text{l ILS 600}) \times (\text{电泳样本量})] + [(1.5\mu\text{l Blue Dextran 上样溶液}) \times (\text{电泳样本量})]$

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）。

4. 将1.0μl PowerPlex®1Y 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**。将顶部缓冲液槽加盖，关闭仪器门。

10. 将顶部缓冲液槽加盖，关闭仪器门。

凝胶电泳及检测

1. 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**2.5**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**2.5**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 HCl**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

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

（4/09）

CTMD018

为了便于对由PowerPlex[®]YSystem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

1. GeneMapper[®]ID的用户可以从Promega公司网址：
www.promega.com/geneticidtools/panels_bins/ 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：

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。

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: **Chinatech@promega.com** 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PowerPlex Y advanced。
6. 点击选择Allele界面（Figure 3）。



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。

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。
9. 在使用PowerPlex[®]Y System时，参照Figure 3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 NewFeatures 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 4 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)”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。

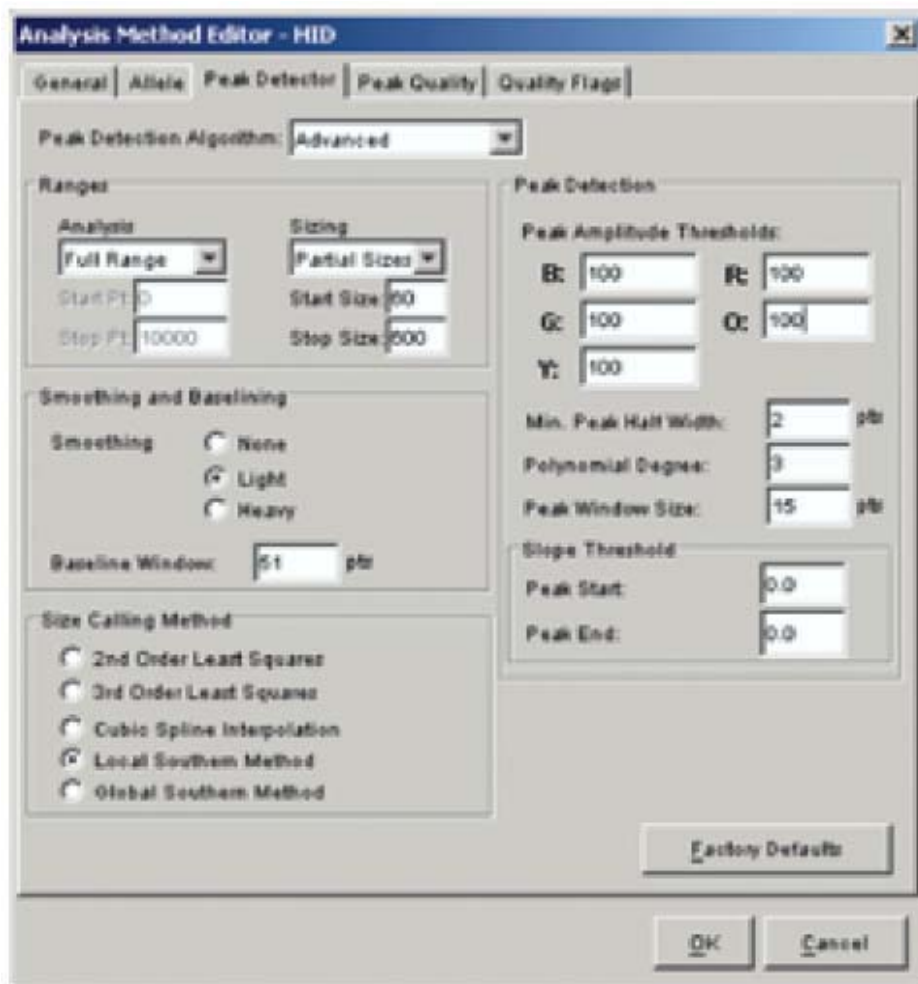


Figure 4. Peak Detector 界面

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

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 600advanced**。

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**）。

8. 点击 **OK**。

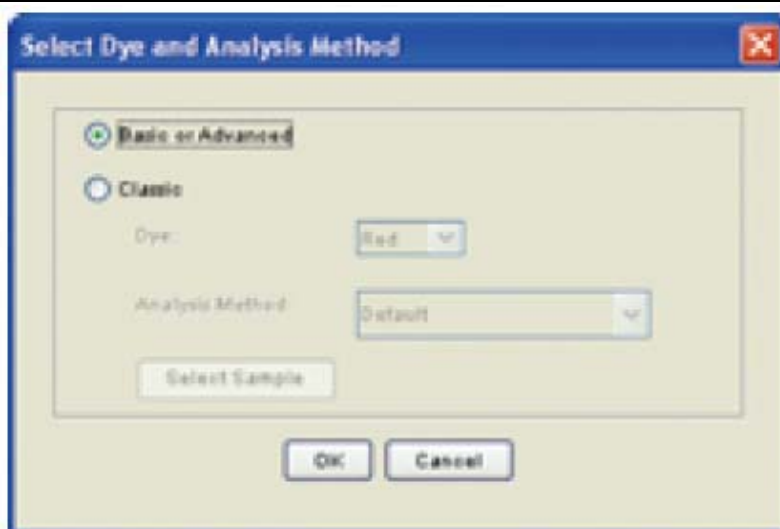


Figure 5. Select Dye and Analysis Method 视窗

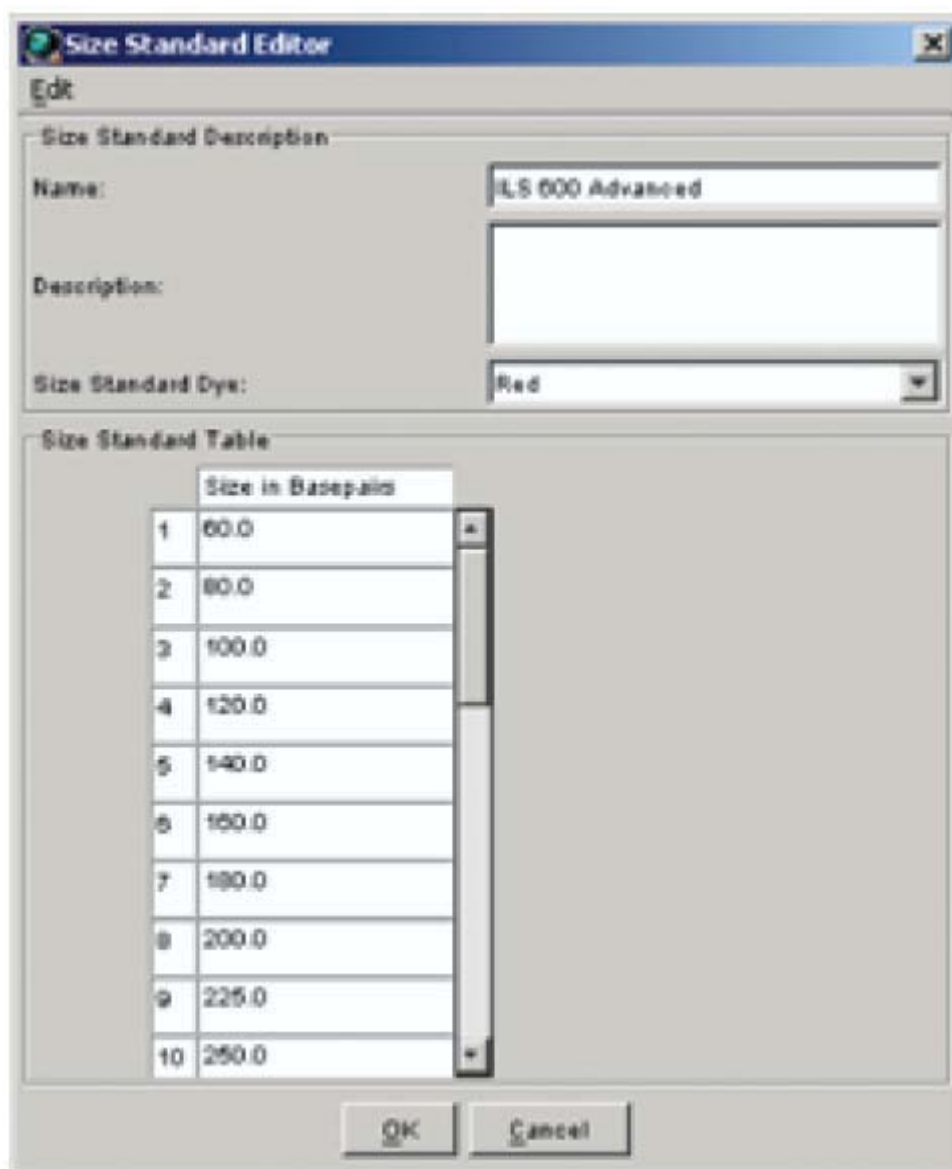


Figure 6. 标准片段编辑

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。
2. 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。
4. 在Panel栏目中选择PowerPlex_Y_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。
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.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: **Chinatech@promega.com** 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 PowerPlexY_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。

9. 在使用PowerPlex®Y 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*。



Marker Repeat Type :		Tet	Tetra	Penta	Hexa
Cut-off Value		0.0	0.2	0.2	0.0
MinusA Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
MinusA Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	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	3.75	0.0
	To	0.0	4.75	5.75	0.0
Plus Stutter Ratio		0.0	0.0	0.0	0.0
Plus Stutter Distance	From	0.0	0.0	0.0	0.0
	To	0.0	0.0	0.0	0.0

Amelogenin Cutoff: 0.2

Range Filter... Factory Defaults OK Cancel

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

创建标准片段

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 600advanced。
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)。
8. 点击OK。

数据库或亲子鉴定样本数据处理

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。
2. 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 Databasing or Paternity Analysis Method”中创建的分析方法。
4. 在Panel栏目中选择PowerPlex_Y_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。

6. 如果分析数据来自ABI PRISM[®]310型遗传分析仪或ABI PRISM[®]377DNA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。
2. 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。

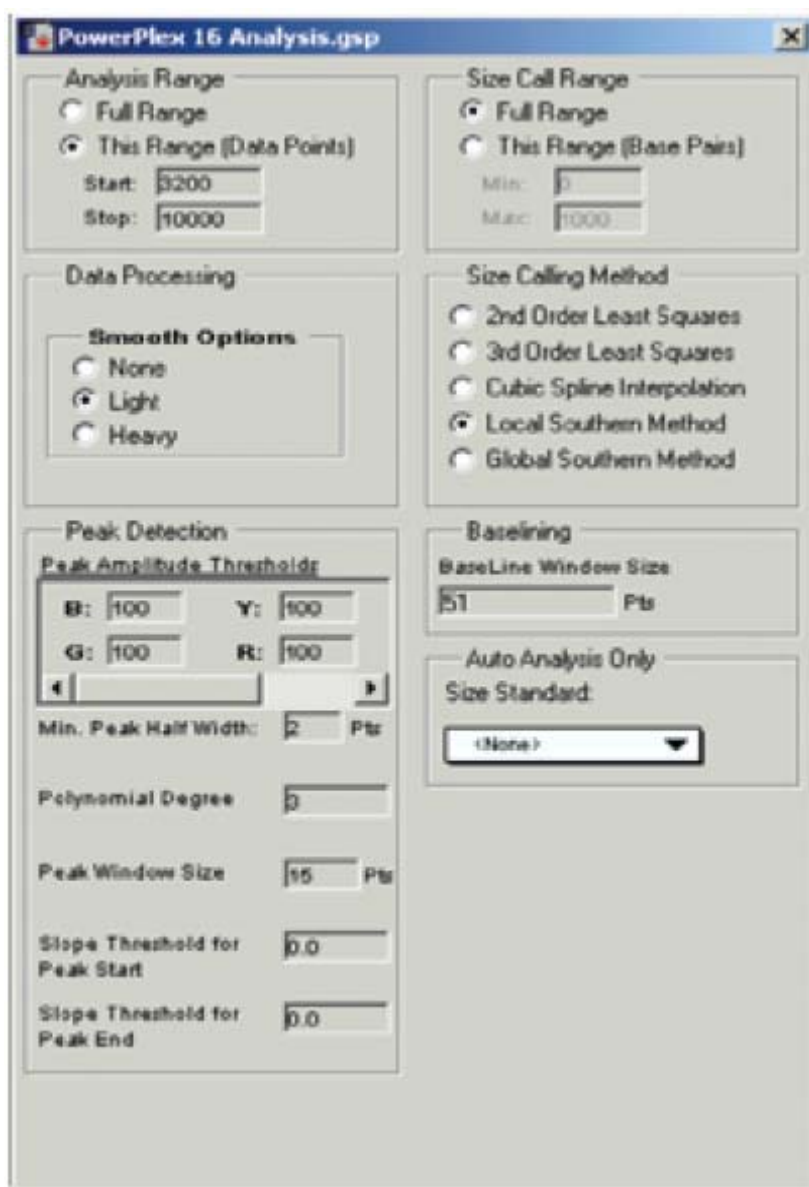


Figure 8. 分析参数视窗分析范围的起点因仪器不同而不同，具体说明请参阅章节VI.D，步骤2

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。
6. 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.D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. Y Macro** (版本2.0) 和 **GeneScan[®]** 软件的帮助信息, 请参阅章节VI.F。

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。
2. 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。
3. 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。
2. 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 Thresholds ² : 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。
6. 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.D中的Figure13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. Y Macro（版本2.0）和GeneScan[®]软件的帮助信息，请参阅章节VI.F。

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. 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。

2. 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。
3. 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[™] Y Macro软件分析样本数据

为了便于对由PowerPlex[®] Y 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[®] Y 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[™] Y Macro软件（版本2.0）分析。

Promega公司提供PowerTyper[™] Y Macro软件（版本2.0）。PowerTyper[™] Y 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：www.promega.com/geneticidtools/ 下载。

PowerTyper[™] Y 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PowerTyper[™] Y 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）栏目中的等位基因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。

1. 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[™] Y Macro 2.0版本。

2. 打开 Genotyper[®] 软件及 PowerTyper[™] Y Macro 2.0 版本软件。有关 Genotyper[®] 软件遇到的问题，请参阅 *Genotyper[®] Analysis Software Users 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 **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）。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。

6. 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，**DYS391**，**DYS389 I**，**DYS439** 和 **DYS439 II**），绿色荧光

标记(JOE)的等位基因Ladders(例如, DYS438, DYS437, DYS19和DYS392), 及黄色荧光标记(TMR)的等位基因Ladders(例如, DYS393, DYS390和DYS385)。确认等位基因Ladders标记全部正确。(Figure 10 章节VI.H)。

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进行分析。

PowerTable Format

Sample Info	Sample Comment	Category	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Overflow	Low Signal	Saturation	Edited Label	Edited Row

Allele Table Format

Sample Info	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category Allele 2	Category Allele 1	Category 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。
2. 观察9948阳性对照男性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9948 DNA等位基因全部位点分型参见Table 5（章节IX.B）。

VI.H. 结果

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

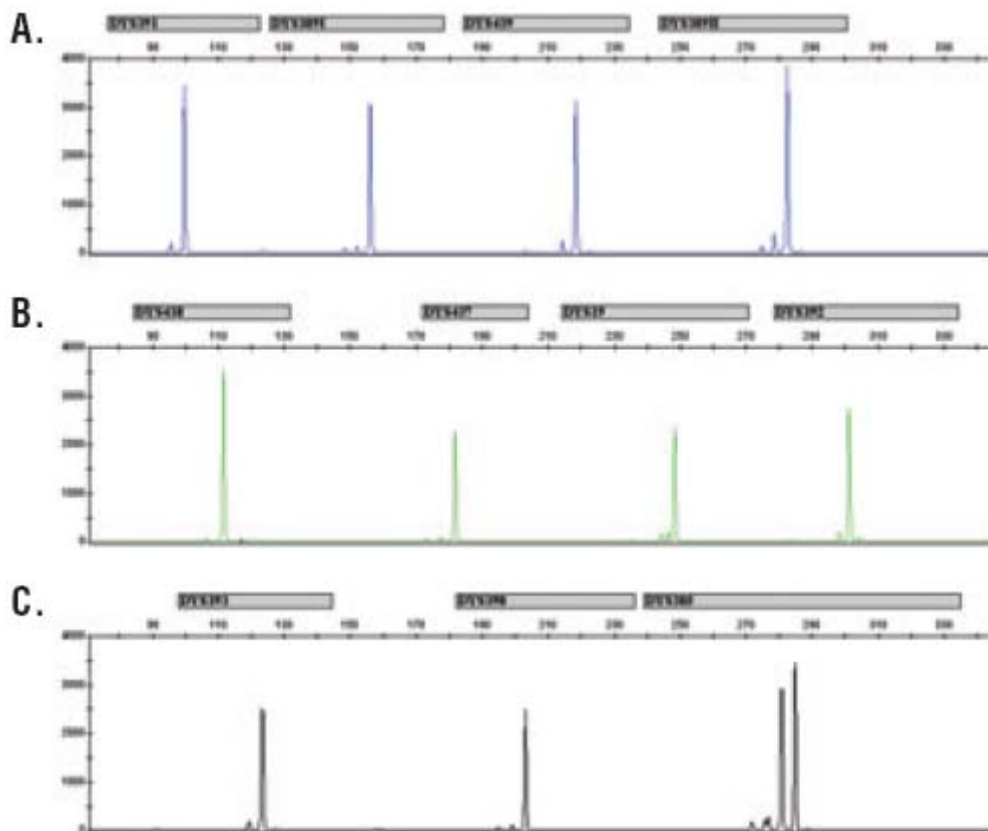


Figure 9. PowerPlex® Y System

使用PowerPlex®Y10×Primer Pair Mix扩增单一男性模板DNA（0.5ng）。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、3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：DYS391，DYS391 I，DYS439，和DYS389 II。Panel B. 使用JOE-标记位点的电泳峰图：DYS438，DYS437，DYS19和DYS392。Panel C. 使用TMR-标记位点的电泳峰图：DYS393，DYS390和DYS385。

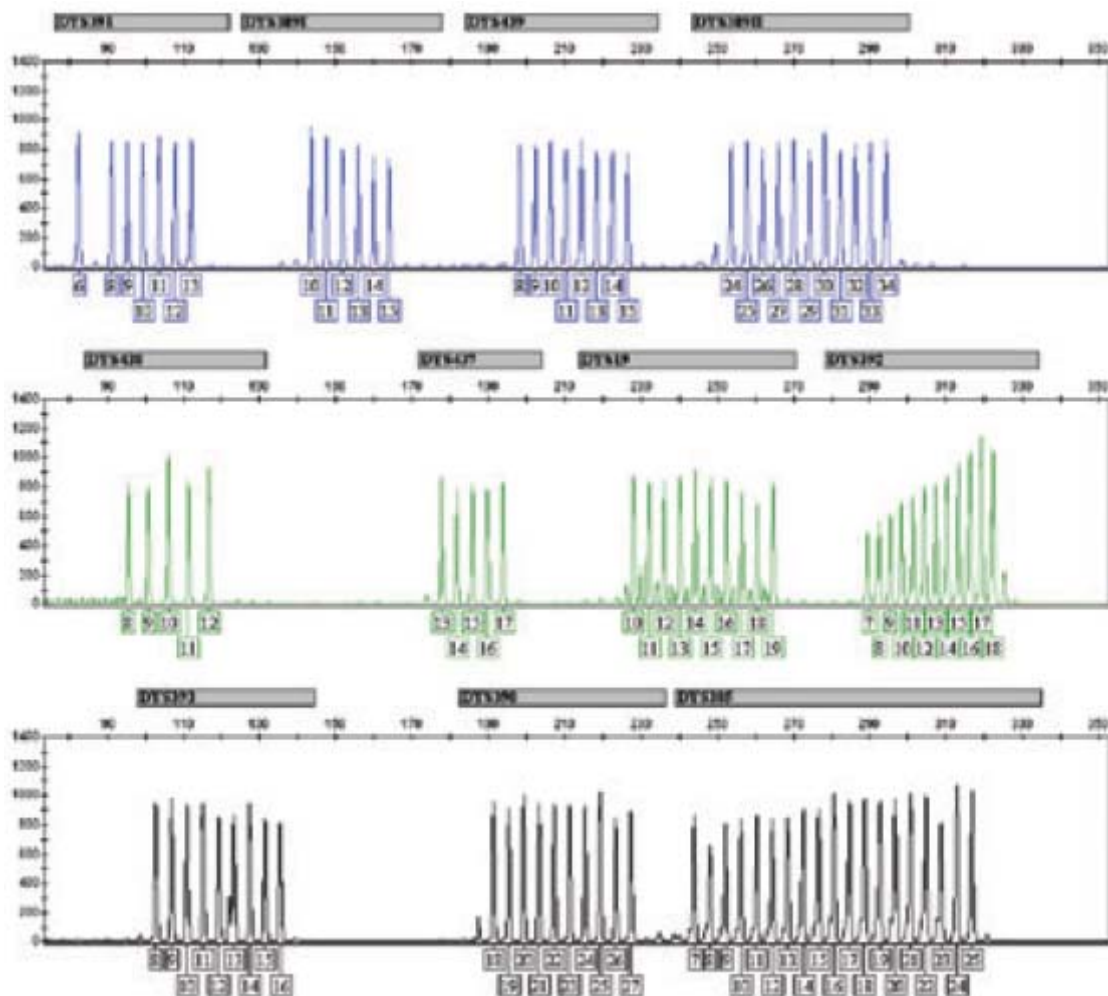


Figure 10. PowerPlex®Y System等位基因Ladder混合液。

在Applied Biosystems 3130型遗传分析仪上，使用3kV电压、3秒进样时间模式PowerPlex®Y System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®Y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，对于相同的基因座，它的图形及强度会因为使用不同的引物而不同，这是反应、扩增条件以及标记链的方向的差异引起的。对于高信号/模板比值的样品，影子带产物经常出现在正确等位基因峰以下1个偶尔是2个重复单位处（表4）。除了影子带峰以外，有些 PowerPlex

[®]Y 基因座处也可观察到一些类似于影子带的峰。对于高信号/模板比值的DYS392 基因座及偶尔可见的其它基因座可出现大于正常等位基因1 个重复的峰。DYS19 及DYS389II 会在 n-2 和 n +2 的位置（低于或高于正常等位基因2 个碱基）出现低水平产物，对于 DYS19, n-2 产物最为常见。DYS437及DYS385 也可以在 n-5 位置出现低水平峰，DYS437，DYS385和DYS393 出现 n -9 产物。

影子带及影子带类似峰的强度与信号强度直接相关，结果可以根据实验室的情况进行优化。应该进行实验室内部的确认实验。

在 JOE 标记的峰DYS438,无等位基因出现的区域会出现低水平假峰，位置大约 114-120bp 处。这些假像不是因为模板而引起的，而且在阴性对照及低产量产物分析中也会出现。这些假峰的峰高会随着进样时间的增加或电压的升高而增加。除此之外，在DYS393和DYS390之间的未命名区域会看到低水平的假峰，并且在 TMR荧光通道中的150—165bp位置上也会看到。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。在扩增样品中，在蓝色 (<70bp)，绿色 (<90bp)及黄色 (<95bp)均可观察到低于等位基因应答峰的杂峰出现，在等位基因阶梯中，也可观察到低水平假峰；最显著的是出现在DYS389II 之上的一系列峰。总而言之，与等位基因梯度峰相关的任何假峰的强度和位置并不影响对结果的分析。另外，通过减少进样时间或上样体积可以降低它们的强度，或者将域值提高到超出可见杂峰的水平。

DYS385a/b 协同

有关DYS385a/b 基因座的非协同性证明在先前已有所阐述。在 Kayser 最初发表的引物序列中，在引物结合位点但在重复区以外引入了一个单碱基缺失（11,13,21）。另外一套引物序列由Schneider(22) 发表，得到的扩增产物要小得多并包含突变区。利用Kayser 引物扩增DYS385a/b 非编码区，比用Schneider 引物得到的扩增产物少一个碱基。现在普遍使用的是Schneider 引物(13)。PowerPlex [®]Y 系统使用Schneider 引物结合位点以得到更高的男性特异性，产生的扩增产物与Kayser 位点相比要小得多。协同/有效性验证由U.S. National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Material (SRM) 2395 Human Y-Chromosome DNA Profiling Standard (Gaithersburg, MD) 完成。

VII. 问题及解决方案

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

(4/09)

www.promega.com.cn

CTMD018

对于此处没有提及的问题，请联系您当地的Promega分公司（办事处）或代理商。联系信息请登陆：www.promega.com, E-mail: 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 模板量不足 模板量不足 酶活性不足 扩增程序不正确 盐浓度过高或PH值改变 热循环仪，平板或试管问题 引物浓度过低	模板用量过少，这个原因非常罕见。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。请使用推荐量的模板DNA。 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（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LS600的用量的方法达到。这些方法需要通过实验室内的认证。 使用推荐量的AmpliTaq Gold® DNA聚合酶，查看试管上标注的保存期限。 确认扩增程序的设置 如果DNA模板保存在TE缓冲液中或过高浓度的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⁺, Mg²⁺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, 0.1mM） 在章节IV.B可查阅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。 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。

在一个或多个通道有额外的杂峰出现	毛细管电泳进样差（内标 ILS600 同样受到影响） 使用的甲酰胺质量差 混有另外一种模板 DNA，或者存在先前的扩增产物 样本变性不完全 STR 扩增的非特异峰 背景信号高 毛细管电泳（CE）相关的非特异产物（尖刺峰） CE 相关的非特异产物（污染物） DNA 过量 拉升或渗透	重新进样。检查注射器是否泄漏，检查激光源。 当电泳时，应使用 Hi-Di™ 甲酰胺。 可能存在交叉污染。应使用防回吸加样头，并且及时更换手套。 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 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”。在章节 VI.H 中获得更多关于阴影带和非特异性扩增的信息。 减少上样量或减少进样时间。（章节 V） 微小的电压变化或尿素结晶通过激光光源时会导致“尖刺峰”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。 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。 扩增时男性 DNA 模板量超过 2ng，会引起大量阴影带的产生。可以减少模板量或者是扩增循环数减少 2-4 个（循环数为 10/20 或者 10/18）。 当峰值过高或者应用于样本的 Matrix 不正确或质量不高时，就会产
-------------------------	---	---

等位基因Ladder与样本不相同	长期存放于甲酰胺中的扩增样品会产生降解。 CE聚合胶 仪器维护 等位基因Ladder与引物对混合物不匹配 缓冲液不匹配 甲酰胺质量不高 等位基因Ladder与样本是否匹配 毛细管电泳多次后,会发生样本的轻度偏移 等位基因Ladder电泳质量不佳	生拉升现象。 •如果是ABI PRISM[®]310 遗传分析仪或377DNA测序仪,需要生成一个新的Matrix 然后将其用于样本。如果是 ABI PRISM[®]3100 和 3100-Avant 型 遗 传 分 析 仪 或 AppliedBiosystems3100和3100xl型遗传分析仪,需要进行一次新的光谱校正,然后将样本重新电泳。 •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。 使用新鲜的甲酰胺重新制备样品。 CE聚合胶超过保质期,或者将聚合胶在室温放置时间超过一个星期。 按照用户使用手册推荐的操作,每天或每周进行仪器的维护。 应确保等位基因Ladder与引物对混合物来自同一个试剂盒。 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★R1×Buffer。 当分析样本时,仅使用Hi-Di™甲酰胺。 应确保等位基因Ladder与样本在同一台仪器进行电泳。 这可能由于多次电泳后,毛细管柱温会发生改变。将等位基因Ladder和样本重新同时电泳进行片段长度的检测。 在每次电泳中可包含多个Ladder。
-------------------------	---	--

峰高不平衡	DNA过量	如果扩增的模板量大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。

VII.B. GeneMapper[®]ID 分析软件

问题	原因	评论及推荐的解决问题
等位基因未命名	GeneMapper [®] ID 分析软件	当使用GeneMapper [®] ID软件分析样本时，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”。如果他们是不一样的，就会产生错误信息（Figure 10）。
	标注的 ILS600 片段数量不	确保ILS600至少有一个片段小于样

Ladder 外的等位基因座 (OL峰现象)	够 电泳时间过短, ILS的大一些的片段未被仪器收集。 使用的等位基因Ladder与样本来源于不同的电泳过程 GeneMapper®ID 软件要求从样本的同一文件夹中导入等位基Ladder。 用于STR 系统的Panel文件选择错误。 等位基因Ladder 在分析方法一栏选择了错误的分析模式 没有正确的标注样本中的内标片段 在章节VI.B中选择的部分区域的数据起始点不确 在改进模式的片段标准中有额外峰 电泳时间过短, ILS的大一些的片段未被仪器收集。	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。 在电泳过程中, 没有检测到全部的已定义ILS600片段标准。 •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。 使用同时电泳的等位基因Ladder重新分析样本。 确保等位基因Ladder与样本在同一文件夹中。新建一个Project程序, 并且重新分析。请参阅章节VI.B或VI.C。 选择与扩增时使用STR系统相对应的Panel文件。 在样本类型一栏中, 对于等位基因Ladder没有标注为“Allelic Ladder” 确保使用“HID”分析模式 需对样本中的长度片段标准进行手动定义。 在分析模式中调节数据起始点, 或者使用全片段分析。 打开片段匹配编辑器, 点亮额外峰, 选择“编辑 (Edit)”, 然后点击“删除片段标记 (delete size label)”, 最后选择“自动调节片段 (auto adjust sizes)”。 在电泳过程中, 没有检测到全部的已定义ILS600片段标准。 •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 错误信息“Either panel, size standard, or analysis method is invalid” 基因座未命名，但是没有显示错误信息 错误信息“Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit” 基线明显升高	峰值低于阈值 某些内标峰质量差 片段标准与分析方法未在同一模式下（“Classic”或“Basic or Advanced”） 没有对样本选择Panel 没有选择片段标准 片段标准定义错误，或片段峰丢失 指向分析方法的Bin设置被删除 在分析方法的Alleles一栏中选择了错误的Bin设置 仪器相关 分析方法使用Classic Mode	在分析方法设置中，降低红色荧光通道的峰阈值。 直接对样本定义片段标准，跳过这些峰。 确保两个文件设置在同一个模式下，要么“Classic”，要么“Basic or Advanced”。 在“Panel”一栏中，选择与使用的STR系统相同的Panel选项。 在“片段标准”一栏中，确保选择了相应的片段标准。 重新定义片段标准，仅包含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。 在 GeneMapper[®] Manager 中选择 Analysis Method 一栏，打开相应的分析方法。选中 Alleles 一栏，选择相应的 Bin 设置。 确保选用了相应的 Bin 设置，如 Figure 3 所示。 •ABI PRISM[®] 3100、3100-Avant 型遗传分析仪、Applied Biosystems 3130 和 3130xl 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。 对样本使用 Classic 模式进行分析
---	---	---

在分析样本时，出现红色警示，并且当数据显示时会出 现下面的错误信息“Some selected sample(s) do not contain analysis data. Those sample(s) will not be shown” 准备导入 Panel 和 Bin 文 件时，显示错误信息 “Unable to save panel data java.SQLEException ORA-00001: unique constraint (IFA.CKP_NNN) violated” 等位基因Ladder中的峰被 标记在Ladder范围以外	在 ABI PRISM[®]310 型遗传 分析仪上电泳样本时，都没 有应用 Matrix，则无数据显 示。 不同的Panel和Bin设置发生 冲突。 GeneMapper[®]ID 软件	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。 使用GeneMapper[®]ID软件分析数 据时需导入Matrix文件，并且重新进 行分析。 Panel和Bin设置全部删除，从另外 一种路径重新导入文件。 GeneMapper[®]ID软件或微卫星分 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 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	评论及推荐的解决施
无法打开计算机中的文件	未安装Genotyper®软件	确 保 安 装 Genotyper®2.5 (Macintosh®) 或 Genotyper®3.6 (WindowsNT®) 或更高版本的软件。
	Genotyper®软件版本不正确	PowerTyper™ 16 Macro 不 能 在 Genotyper®2.5之前的版本中运行。
	CD-ROM在运输中被损坏	请 联 系 技 术 服 务 部 门， E-mail : Chinatech@promega.com。
	文件在下载或传输的过程中被损坏	重新下载，或从CD-ROM上获得文件。
错 误 信 息 “Could not complete the“Run Macro”command because no dye/lanes are selected”	未识别到等位基因Ladder文件	确 保 在 含 有 等 位 基 因 Ladder 混 合 物 的 通 道 信 息 栏 (sample info或color infor) 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 complete the“Run Macro”command because the labeled peak could not be found”	等位基因Ladder中一个或多个等位基因的峰值低于 150RFU	等 位 基 因 Ladder 的 最 小 峰 值 高 度 被 定 义 为 150RFU，如 果 低 于 此 值，软 件 无 法 识 别 及 定 位。需 使 用 更 多 的 样 本 量 或 延 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 Ladder 峰	将 等 位 基 因 Ladder 重 新 上 样 电 泳。
	GeneScan®分析参数中	将 分 析 参 数 设 定 为 “light smoothing”

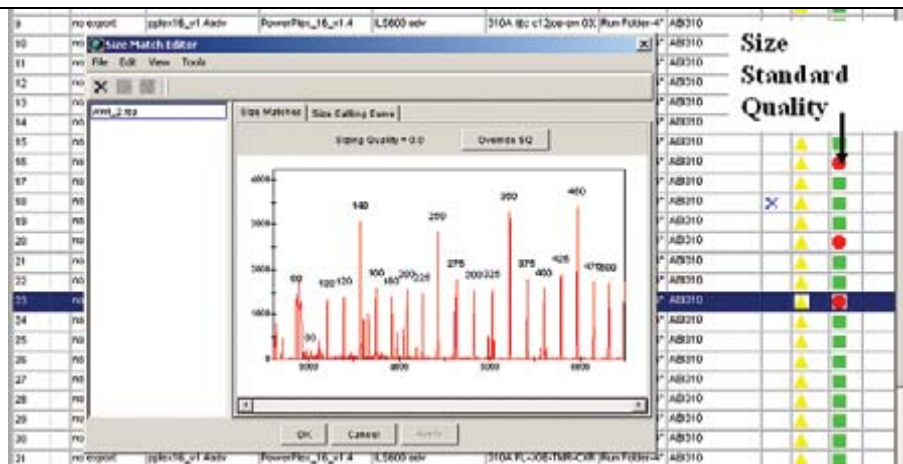


图12 在GeneMapper® ID软件中片段标准分布不正确的示意图

VIII. 参考文献（略）

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不同长度的片段构建等位基因阶梯(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®Y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®Y系统所含位点的优势

PowerPlex®Y 系统所采用的基因座（Table 4 和 Table 5），具有很好的代表性并被法医机构所认可。此多基因座系统包含了“European minimal haplotype”（DYS19,DYS385a/b,DYS I / II ,DYS390,DYS392 和 DYS393）和 SWGDAM 推荐的 Y-STR 系统，此系统增加了除“European minimal haplotype”之外的 DYS438

和 DYS439。登录 www.ystr.org 可获得 European minimal haplotype 的更多信息。

PowerPlex[®]Y系统所包括的等位基因ladder包含了所观测的每一个基因座的最常见的变异体。表5中列举了等位基因ladder的等位基因和男性DNA标准模板9948的单模标本。

表4 PowerPlex[®]Y系统的特异位点信息

STR位点	标记	染色体位置	GenBank [®] 号	重复序列 ¹ 5→3
DYS391	FL	Yq	G09613	TCTA(14)
DYS389 I/II	FL	Yq	AF140635	[TCTG][TCTA] Complex(14)
DYS439	FL	Yq	AC002992	GATA(26)
DYS393	TMR	Yq	G09601	AGAT (14)
DYS390	TMR	Yq	AC011289	[TCTG][TCTA] Complex (14)
DYS385a/b	TMR	Yq	Z93950	GAAA (14)
DYS438	JOE	Yq	AC002531	TTTTTC (26)
DYS437	JOE	Yq	AC002992	[TCTA][TCTG] Complex (26)
DYS19	JOE	Yq	X77751	TAGA Complex (14)
DYS392	JOE	Yq	G09867	TAT (14)

¹The August 1997 report (27,28) 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”.

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine

FL = fluorescein

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

Table 5. PowerPlex[®]Y系统等位基因Ladder信息

STR Locus	Label	Size Range of Repeat Numbers of Alleles Observed in
-----------	-------	---

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

(4/09)

CTMD018

		Allelic Ladder Components¹ (bases)	Allelic Ladder Components	9948 Male DNA Positive Control²
DYS391	FL	90–118	6, 8–13	10
DYS389I	FL	148–168	10–15	13
DYS439	FL	203–231	8–15 ³	12
DYS389II	FL	256–296	24–34	31
DYS393	TMR	104–136	8–16	13
DYS390	TMR	191–227	18–27	24
DYS385	TMR	243–315	7–25	11, 14
DYS438	JOE	101–121	8–12	11
DYS437	JOE	183–199	13–17	15
DYS19	JOE	232–268	10–19	14
DYS392	JOE	294–327	7–18	13

¹When 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.

²Information about the use of 9947A and 9948 DNA as standard DNA templates can be found in reference 29.

³Follows the original nomenclature described by Ayub *et al.* (26).

我们成功的筛选了可以避免或者是减少非特异性扩增的引物，包括与其相关的 **taqDNA** 聚合酶，例如重复单元的滑移和末端核苷酸的增加。重复单元的滑移，有时被称作“n-4带”“阴影带”或“影子带”，这种滑移是由于DNA在复制过程中重复单元的丢失，DNA在体内的变异，或者是这两者共同引起的。观察到的非特异性条带的数量主要取决于位点以及DNA序列的复制。

末端核苷酸添加是由于 **Taq** 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（35，36）。

IX.C. 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®Y 检验得到了证实。订购信息请参阅章节 IX.G。

开发的Plexor®HY系统可用于人类DNA的定量，订购信息请参阅章节IX.G。

DNA IQ™ System已经在Beckman Coulter Biomek®2000实验室，Biomek®3000实验室的自动化工作平台Tecan Freedom EVO®液体处理器上得到应用（41）。除此之外，还有用于Maxwell 16的DNA IQ™ Reference Sample试剂盒和DNA IQ™ 案例样品试剂盒。关于实验室自动工作站的信息可咨询Promega的当地分公司或经销商：

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

IX.D. 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。

注意：PowerPlex[®]Y系统需要检测并标定ILS600的375碱基的峰值，目的是精确标定所观察到的最大等位基因的大小

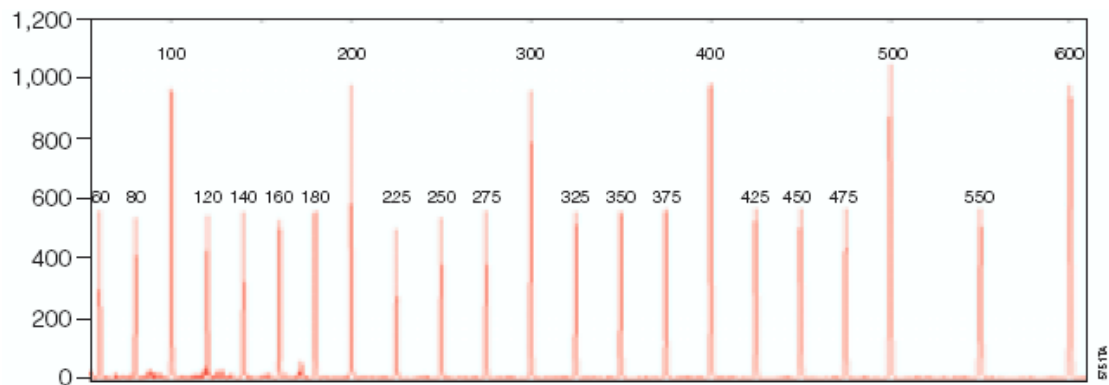


Figure 13. 内标 ILS600

IX.E. PowerPlex[®]Y 系统扩增混合体系的制备

Table 6 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 ）。

PCR Component	Master Mix	Volume Per Reaction	$\times$	Number of Reactions	=	Final Volume(μl)
Gold ST★R	10X	2.5 μl	$\times$		=	
Buffer						
PowerPlex [®] Y	10X	2.5 μl	$\times$		=	
Primer Pair Mix						
AmpliTaq Gold [®]		0.55 μl (2.75u)	$\times$		=	
DNA polymerase ¹						
nuclease-free water ²		μl	$\times$		=	
Per tube			$\times$		=	
template	DNA	Up to 19.45 μl	$\times$		=	
volume2(0.25–1ng)						
total reaction volume		25 μl				

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。考虑到模板 DNA 的体积，可以向反应混合液中加入去核酸水，以使终反应体系到达 25μl。

IX.F. 缓冲液及溶液组分

10%过硫酸铵

将 0.05g 过硫酸铵溶于 500μl 去离子水中。

Blue Dextran上样缓冲液

88.25% 甲酰胺

15mg/ml Blue Dextran

4.1mM EDTA (PH8.0)

Gold ST★R 10X Buffer

500mM KCl

100mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)

15mM MgCl₂

1% Triton[®]X-100

2mM each dNTP

1.6mg/ml BSA

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**	150µl	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

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

(4/09)

www.promega.com.cn

CTMD018

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	20µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1,000µl	800	DY1131

(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 Applied Biosystems 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 Applied Biosystems 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. Nalge 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.