# PowerPlex® Matrix Standards, 3100



www.promega.com

原英文技术手册号码: TBD016

# 本说明书用于产品 DG3380

所有的技术文献均可从公司网站<u>www.promega.com</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

I.	介绍	1
II.	产品组分	2
III.	. 在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上产生 PowerPlex®光谱校正文件	2
	A、 光谱运行模式 ······	2
	B、 光谱参数 ······	2
	C、Matrix 样品制备······	3
	D、 仪器准备·······	3
	E、 光谱校正运行	4
	F、 光谱校正结果······	4
IV.	样品 DNA 扩增······	4
***	TT 4.D.T. DD.T.C.V.® 04.00 V# 4.L. // J.T. // J.M. J.M. J.M. L.M. T.M. T.M. T.M. T.M. T.M. T.M. T	,
V.	<b>用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪检测扩增样品·······</b> A、样品制备·······	
	A、件 品 制 备 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	5
	C、样品运行····································	5 6
	D、数据分析········	6
	E、PowerTyper <sup>TM</sup> Macros·······	7
VI.	疑难解答······	Q Q
11.	<b>水-/                                      </b>	O
VII.	相关产品	8

# I. 介绍

产生合适的光谱校正文件,是用 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪评估多色荧光系统的关键。用于 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪的 PowerPlex<sup>®</sup> Matrix Standards,3100 试剂盒含有用 4 种不同荧光素标记的片段: 一个管含有用 6-羧基-4′,5′-双氯-2′,7′-双甲氧基荧光素(JOE)标记的 160bp 的片段,一个管含有用荧光素(FL)标记的 250bp 的片段,一个管含有用羧基一四甲基罗丹明(TMR)标记的 300bp 的片段,一个管含有用羧基-X-罗丹明(CXR)标记的 350bp 的片段。

这些 Matrix 片段混合后,用于在 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上完成"dye set Z"的光谱校正。生成的光谱校正文件可用于 PCR 样品检测中计算互相重叠的 4 种不同颜色的光谱。 PowerPlex® Matrix Standards,3100 专为 PowerPlex® 16 和 1.2 系统所设计,也能用于任一个 GenePrint® 荧光 STR 系统。

每一台 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪均需独立产生一个 Matrix。ABI PRISM® 3100 遗传分析仪的操作手册可从制造商获得。

若需获取 Promega 其他 STR 荧光系统的信息,参考 GenePrint<sup>®</sup> 荧光 STR 系统技术手册 TMD006; PowerPlex<sup>®</sup> 1.1 荧光 STR 系统技术手册 TMD008; PowerPlex<sup>®</sup> 1.2 系统技术手册 TMD009; PowerPlex<sup>®</sup> 2.1 STR 系统技术手册 TMD011; PowerPlex<sup>®</sup> 16 系统技术手册 TMD012。这些技术手册和进一步的产品信息可以登陆 Promega 网站www.promega.com或直接从 Promega 索取。



# II. 产品组分

产品	目录号
PowerPlex® Matrix Standards, 3100	DG3380

### 包括:

- 20 μ 1 JOE160 Matrix Standard
- 20 µ 1 FL250 Matrix Standard
- 20 µ 1 TMR 330 Matrix Standard
- 20 µ 1 CXR 350 Matrix Standard
- 1.25ml Nuclease-free water
- 1 技术手册

**保存条件:** 所有组分保存在-20℃。Matrix 标准中的片段是光敏的,必须保存在黑暗中。 建议这些组分和扩增后试剂一同保存并使用不同的加样器和管架等。

# III. 在ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上产生 PowerPlex®光谱校正文件

### 用户提供的材料

- 加热块、水浴箱或热循环仪
- //k
- 用于 3100 的 capillary array, 36cm
- 用于 3100的 Performance Optimized Polymer 4 (POP-4)
- 含 EDTA 的 10×遗传分析仪缓冲液
- 用于 3100 的 sample tubes 和 septa
- 防污染的加样头

**注意:** 为了使建立的光谱校正系统成功运行,需要改进两个文件,第一个为运行模式文件,第二个为参数文件。

# A、光谱运行模式

- 1. 打开"ABI PRISM® 3100 collection"软件。
- 2. 打开"tools"中的"module editor". 在"calibration"菜单下,选择"Spect36\_POP4DefaultModule"模式。
- 3. 改变"Spect36 POP4DefaultModule"模式中的"Run time"从800秒改为2000秒。
- 4. 在新文件名下保存改变后的模式(如使用新文件名 "Spect36\_P0P4 PowerPlex")。此为所有使用 PowerPlex Matrix Standards, 3100 进行光谱校正的运行模式。

### B、光谱参数

- 1. 光谱参数文件的打开路径为:
  - D:\appliedbio\SupportFiles\Dafa Collection Support Files\Calibration Data\Spectral Calibration\ParamFiles
- 2. 选择"mtxStd{Genescan\_SetD}.Par"。这将打开Microsoft®Notepad中的".par"文件。
- 3. 改变"Condition Bounds" 范围到[6.0, 9.0]。
- 4. 用一个新文件名存贮参数文件,(如使用 mtxStd {Genescan\_SetZPowerPlex}), 此为所有使用 PowerPlex® Matrix Standards, 3100 进行光谱校正运行的参数文件。

# C、 Matrix 样品制备

注意:测试的灵敏度依仪器而变化,下列推荐的 Matrix 样品稀释度可依据不同实验室所用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪的灵敏度而进行优化。

Promega
Precision Design... for Life
www-promega-com

1. **高浓度片段的初始稀释:** 在四种荧光标记的 DNA 片段混合前,先用无核酸酶的 水按 1:10 稀释每一个片段,涡旋振荡混匀。

	JOE	FL	TMR	CXR
高浓度荧光标记物	2μ1	2μ1	2μ1	2 μ 1
无核酸酶水	18 μ 1	18 μ 1	18μ1	18 µ 1

在高浓度片段的 初始稀释及所稀 释的片段混合时 不要用福尔马林 稀释荧光标记物

2. **片段混合**(**用 1:10 稀释的各荧光标记的 DNA 片段**): 用步骤 1 中初始稀释的荧光标记的 DNA 片段,按下列方式混合。

JOE 标准	5μ1
FL 标准	5μ1
TMR 标准	5μ1
CXR 标准	5μ1
无核酸酶水	480 μ 1

- 3. 在 ABI PRISM  $^{\circ}$  3100 遗传分析仪上,16 个毛细管同时进行 16 个样品孔的 Matrix 检测(96 孔板的 A1 到 H2 孔)。在 96 孔板的 16 个孔(A1 到 H2)的每一个孔中 加入 25  $\mu$  1 步骤 2 中制备的各片段混合液。
- 4. 95℃变性样品 3 分钟后迅速放置在冰上冷冻 3 分钟。将准备好的样品盘放至 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪上进行 Matrix 的生成。

样品变性的时间 不要超过 3 分钟 以防蒸发

### D、仪器准备

- 1. 按照 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪用户操作手册来进行泵清洗,安装毛细管列,进行空间校正,以及向注射器中添加聚合物。
- 2. 打开 ABI PRISM® "3100 collection"软件。
- 3. 打开 "new plate record"。 命名放入仪器中的平板并选择 "Spectral Calibration"。点击"plate type"选择平板大小 (96-孔板或 384-孔板),然后点击"Finish"。
- 4. 完成加样孔的平板记录表。在"Sample Name"栏输入适当的信息。
- 5. 在"dye set"栏,从下拉菜单中选择"Z"。
- 6. 在"spectral run module"栏,从下拉菜单中选择"Spect36\_P0P4PowerPlex"。此为步骤 III. A. 中设置的模式。
- 7. 在"spectral parameters" 栏,从下拉菜单中选择"mtxStd{Genescan\_SetZ PowerPlex}"。此为步骤 III. B. 中设置的文件。

光谱生成反应板的设定如下显示:

Well	Sample	Dye	Comment	Spectral Run	Spectral
well	Name	Set	Comment	Module	Parameters
				Spect36	MtxStd{Genescan
A 1	Matrix	7		Spectoo_	mescan denescan

8. 点击"OK",这个新的平板记录就会出现在收集软件的平板设置页的待定平板记录表中。



### E、光谱校正运行

- 1、在待定平板记录表中,点击设定的平板记录名。
- 2、一旦平板记录标出,点击平板图,此平板图与自动进样器中含有光谱校正样品的平板相对应。
- 3、一旦平板记录与平板连接,平板图会从黄色变为绿色,平板记录就从待定平板记录表变为连接平板记录表。此时仪器运行键"▲"被激活。
- 4、点击工具栏中绿色的″▲ ″来起始光谱校正运行。

# F、光谱校正结果

- 1、在光谱校正运行完成后,"Spectral Calibration Result"视窗打开,指示哪些毛细管通过了校正。"•"表明毛细管通过校正,"X"表明毛细管未通过校正。
- 2、点击"OK"。
- 3、浏览光谱校正数据,在收集软件的工具菜单中,选择"Display Spectral Calibration"。
- 4、点击"Dye Set"键,从下拉菜单选择"Dye Set Z",然后点击"OK"。
- 5、"Matrices for Dye Set Z"视窗显示每一个毛细管的光谱校正资料。用滚动条来阅览 16 个毛细管的数据。对于 PowerPlex® Matrix Standards, 3100, 毛细管必须满足下列条件才能通过校正:
  - Q-value 必须大于 0.95。
  - Condition number (或 C-value) 必须在 6.0 到 9.0 的范围内。
- 6、点击"OK"来关闭视窗。
- 7、如果一个毛细管未通过校正,会从左边最临近的一个通过校正的毛细管自动生成光谱数据,建议 16 个毛细管中**至少**有 12 个应通过校正。如果少于 12 个毛细管通过校正,必须重新进行光谱校正。当重新光谱校正运行时,必须重新稀释一份浓缩的 Matrix 标准,并设立新的片段混合物。关于光谱校正疑难解答请参照章节 VI。

# IV. 样品 DNA 扩增

PowerPlex® Matrix Standards, 3100 所产生的光谱校正文件适用于 Promega 公司的 PowerPlex®16 系统,PowerPlex®1.2 系统及其它 GenePrint®荧光 STR 系统。DNA 样品的扩增需参照相应试剂盒的技术操作手册所规定的条件进行。请参照 GenePrint® Fluorescent STR System 技术手册 TMD006,PowerPlex®1.2 系统技术手册 TMD009,及 PowerPlex®16 System 技术手册 TMD012。这些技术手册和相关的产品信息可以登陆网站 www. promega. com 或直接从 promega 索取。

# V. 用 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪检测扩增样品 用户提供的材料

- 加热块、水浴箱、或热循环仪
- 冰
- 3100 毛细管列, 36cm
- •用于3100的电泳胶(POP-4)
- 含 EDTA 的 10×遗传分析仪缓冲液
- •用于3100的样品管或隔
- 防污染加样头
- 去离子甲酰胺, 电导率<100 μ s/cm (Amresco 超纯级, 目录号#0606)

**注意**: 甲酸胺的质量很关键,使用电导率 <100 μ s/cm 的甲酰胺。甲酰胺可以分装并在-20° C 冰冻保存。多次冻融或在 4° C 长期保存会使甲酰胺降解。电导率 <100 μ s/cm 的甲酰胺含有离子,在进样时和 DNA 竞争。这将降低样品的峰值和灵敏度。增加进样时间不会增加信号强度。

# A. 准备样品

在 PowerPlex<sup>®</sup>16 系统中带有内标 600 (目录 DG2611),作为四色荧光检测及扩增样品分析的内标 (ILS)。荧光梯度 (CXR),60-400 碱基 (目录号 DG6221)包含在 Powerplex<sup>®</sup>1.2 系统中,也可用于 GenePrint<sup>®</sup> Fluorescent STR 系统。

- 1、按下面方法准备由内标及去离子甲酰胺组成的上样混合物:
  - [(1.0 $\mu$ 1 内标)×(#进样数)]+[(9.0 $\mu$ 1 去离子甲酰胺)×(#进样数)]
- 2、在每一孔中加入10μ1甲酰胺/内标混合物。
- 3、加入1μ1扩增样品(或1μ1等位基因梯度混合物)。

注意:由于不同仪器检测低限的差异,因此,电泳时的进样时间或扩增产物量需要适当增加或减少。如峰值太高(大于 4000rfu),在与加样混合物混合前,扩增样品需要在 Gold ST\*R 1×缓冲液中稀释。这可能导致等位点间不均衡的峰高。为获得最佳结果,可在扩增反应中使用更少量的 DNA 模板,或在扩增程序中减少扩增循环数 2-4 次。

4、95℃变性样品 3 分钟,然后立即放置冰上冷却 3 分钟。变性后的样品板直接装载 到 3100 遗传分析仪进行电泳。

# B. 仪器准备

- 1、按照 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪用户操作手册来进行泵清洗,安装毛细管列,进行空间较正,以及向注射器中添加电泳胶(P0P-4)。
- 2、打开 ABI PRISM® "3100 collection"软件。
- 3、打开"new plate record"。命名放入仪器中的平板并选择"GeneScan"。点击"plate type"选择平板大小(96-孔板或384-孔板),然后点击"Finish"。
- 4、完成已加样孔的平板记录表。在"Sample Name"和"Color info"栏输入适当的信息。对于等位基因梯度样品,在"Color info"栏中对应"dyes"栏"B","G"和"Y"的位置,插入单词"Ladder"。这些信息必须输入以确保用 PowerTyper™16 或 PowerTyper™ 1.2 Macro 对数据的成功分析。
- 5、在"BioLIMS Project"栏,从下拉菜单中选择"3100 Project1"
- 6、在"Dye Set"栏,从下拉菜单中选择"Z"。
- 7、在"Run Module 1"栏,从下拉菜单中选择"GeneScan36 POP4DefaultModule"。
- 8、若收集数据而不进行自动分析,则在"Analysis Module 1"栏中选择"No Selection"。分析参数可在数据收集后,用 GeneScan<sup>®</sup>分析软件进行数据分析时设定。若需要自动分析数据,则需在"Analysis Module 1"栏中,选择适当的分析模式。分析模式的设置指南,参照 ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 遗传分析仪用户手册。设置后的平板记录会出现如下的 GeneScan<sup>®</sup>信息:

Well	Sample Name	Dyes	Color Info	Color Comment	BioLIMS Project	Dye Set	Run Module 1	Analysis Module 1
A1	Sample_1	8	Sample_1		3100_Project1	Z	GeneScan36_POP4DefaultModule	
	1 () ()	G	Sample_1					
		Y	Sample_1					
		RES						
		0						
B1	Allelic_Ladder	B	Ladder		3100_Project1	Z	GeneScan36_POP4DefaultModule	
	-	0	Ladder					
		Y	Ladder					
		REZ						
		0					U	

9、点击"OK"。则新的平板记录 (new plate record) 出现在收集软件 (collection software) 的平板设置页的待定平板记录表 (pending plate records table) 中。



为了调整标准峰高,用于配制上样混合物的内标体积可增大或减小。



### C. 样品运行

- 1、在待定平板记录表中,点击新设置的平板记录名。
- 2、当平板记录变亮,点击平板图。
- 3、一旦平板记录与平板连接,平板图会从黄色变为绿色,平板记录就从待定平板记录表变为连接平板记录表。此时运行仪器键″▲″被激活。
- 4、点击工具栏中的"▲"键起始样品运行。
- 5、在收集软件内,通过观察"run", "status", "array"及"capillary views"视 窗,监测电泳状况。

# D、数据分析

依据随试剂盒一起提供的 Promega 技术手册中描述的方法,用 GeneScan®分析软件进行数据分析。这些技术手册包括: GenePrint®荧光 STR 系统技术手册 TMD006,PowerPlex®1.2 系统技术手册 TMD009,PowerPlex®16 系统技术手册 TMD012。这些技术手册的查询及进一步的产品信息,可登陆 Promega 公司网站www.promega.com或直接从 Promega 公司索取。

有关 GeneScan<sup>®</sup> 分析软件的进一步信息,参照 GeneScan<sup>®</sup> 分析软件用户指南。

# 注意:

- 如在 CXR (红色)峰处出现 TMR (黄色)峰,在红色峰分析参数中,需要提高峰的临界值(如 100-200rfu)。这不会干扰数据分析,因为 CXR (ILS)的峰值应大于 300rfu。
- 理想的样品峰值应小于 2000rfu。
- 当峰值>4000rfu 时,由于仪器饱和(如上样过载)会导致伪峰的产生。可以观察到从一种颜色的峰到另一种颜色峰的拉升或消减现象。
- •如果样品峰值不在仪器的线性检测范围内, stutter 峰和真实等位基因的峰值比会增加, 并且等位基因的命名变得困难。同时会引起峰值的不均衡。
- 不同仪器对同一样品的相对荧光单位检测会有所差异。此外,仪器对不同色谱 检测的相对效率的差异也会影响峰的平衡。

# E. PowerTyper<sup>™</sup> Macros

为了便于分析 PowerPlex® 16 和 PowerPlex® 1.2 系统产生的数据。我们对每一系统设立了应用 ABI GenoTyper® 软件进行基因型自动分析的文件。使用 PowerPlex® 16 和 PowerPlex® 1.2 系统扩增后的样品用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪进行检测并用 GeneScan®分析软件进行数据分析,用 GeneScan®分析软件进行数据分析后的样品文件可以导入到 GenoTyper® 程序内,然后用 PowerTyper™ 16 Macro(目录号 DG2850 或 PowerTyper™ 1.2 Macro(目录号 DG2601)进行分析。两种 PowerTyper™ Macros 可免费从 Promega 公司获取或从 www. promega. com/ geneticidentity/gitech. html 下载。

PowerTyper<sup>™</sup> Macros 可和 Macintosh<sup>®</sup> Genotyper<sup>®</sup> version 2.0 或更高版本以及 Windows NT<sup>®</sup> Genotyper<sup>®</sup> version 3.5 或更高版本兼容。在使用 PowerTyper<sup>™</sup> Macro 前,必须在计算机上安装 GenoTyper<sup>®</sup>软件。

在 Windows NT® version 上使用任一个 PowerTyper™ Macros, 须确认 macro 文件名是"PowerTyper16Macro.gta"或者"PowerTyper12Macro.gta", macro 的名字必须包括".gta"文件扩展名方可被 Windows NT® version 识别。

ABI PRISM® 3100 遗传分析仪产生的数据,可用于 GeneScan®分析软件的 Windows NT® version 进行分析。这些数据可直接导入 Windows NT® Genotyper® version。 在这些数据导入到 Macintosh® version 前,必须运行一个转化效用(可从 ABI 获得)。这个效用使 Windows NT®产生的数据可被 Macintosh® 软件识别。

### 注意:

- 确认等位基因梯度的每一行的"color info"栏中含有"ladder"这个词。Macro 使用"ladder"这个词来确认含等位基因梯度的样品文件。
- 理想的扩增样品峰高应小于 2,000 rfu。





Precision Design... for Life
www•promega•com

对未标于此处的 问题,请与您当地 的办事处或分公 司联系。进一步的 资料可登陆网页

www.promega.com

# VI. 疑难解答

现象	可能原因	评论
少于 12 个毛	Matrix 标准过度	Matrix 样品过度稀释,会导致峰值过低。如果
细管通过光	稀释	matrix 峰值小于 800rfu, 减少本说明书 III. C 第
谱校正		一步中各片段的稀释度。
	Matrix 标准太浓	Matrix 样品峰值太强,会在其它色谱中出现拉
		升或消减,这可能导致光谱校正失败。如果
		matrix 样品峰值过强 (大于 6000rfu),提高本
		说明书 III.C 第一步中各片段的稀释度并重复
		光谱校正运行。另一个选择是减少进样时间以减
		少进样量。

# VII. 相关产品

产品	包装	目录号
PowerPlex <sup>®</sup> 16 System	100 reactions	DC6531
	400 reactions	DC6530
PowerPlex <sup>®</sup> 1.2 System	100 reactions	DC6101
	400 reactions	DC6100

不得用于医学诊断。

# 其他组分

产品	包装	目录号
Internal Lane Standard 600	150 µ 1	DG2611
Fluorescent Ladder CXR, 60-400 Bases	65 µ 1	DG6221
Gold ST★R 10X Buffer	1.2ml	DM2411
Mineral Oil	12m1	DY1151
Nuclease-Free Water	50ml	P1193

# 样品准备系统

产品	包装	目录号
DNA IQ <sup>®</sup> System	400 reactions	DC6700
AluQuant <sup>®</sup> Human DNA Quantitation System	400 determinations	DC1011
不得用于医学诊断。		