技术手册

PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130

DG4650 产品使用说明

原英文技术手册手册号码：TBD022

重要提示：

我们建议本产品只使用一次，然后将其丢弃。

PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130

所有的技术文献均可从公司网站 **www.promega.com/tbs/** 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: **Promega@promega.com.cn** 或 **Chinatech@promega.com.cn**

I. 介绍……1

II. 产品组分及储存条件……2

III. 仪器准备及使用版本 2.0 或数据收集软件进行光谱校正（ABI PRISM® 3100，3100-Avant，3130 和 3130xl 型遗传分析仪）……2

A. Matrix 样品制备……3

B. 仪器准备……3

IV.在 ABI PRISM® 3100 或 3100-Avant 型遗传分析仪上使用版本 1.0.1 或 1.1 数据收集软件生成 PowerPlex® 光谱校正文件……5

A. 光谱校正运行模式……5

B. 光谱校正参数……6

C. Matrix 样品制备……6

D. 仪器准备……7

E. 光谱校正运行……8

F. 光谱校正结果……8

V. 疑难解答

VI. 相关产品……10

I. 介绍

在ABI PRISM®3100，3100-*Avant*，3130和3130*xl*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。PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130含有4种不同的荧光标记的独立片段,每个Matrix片段分装于独立的离心管中，分别用荧光素（FL）、羟基－四甲基罗丹明（TMR）、6-羟基-4′,5′-二氯-2′,7′-二甲氧基-荧光素（JOE）和羟基-X-罗丹明（CXR）标记。

将这些Matrix片段混合，然后在ABI PRISM®3100，3100-Avant，3130和3130xl型遗传分析仪指定的“dye set”程序设置中运行光谱校正程序。对于数据收集软件版本1.0.1或1.1，使用经“ dye set ”F的参数修改得到的“ dye set ”Z进行光谱校正。对于数据收集软件版本2.0或3.0，运行“ dye set ”F进行光谱校正。生成的校正文件会应用于样本的检测过程中，计算相互重叠的四种不同颜色的光谱。每台分析仪都需要独立生成一个Matrix文件。PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130设计用于PowerPlex® 16，Y和ES系统，也可以用于任何一种GenePrint®荧光检测STR系统。ABI PRISM®3100，3100-Avant，3130和3130xl型遗传分析仪的操作流程可从制造商处获取。相关技术手册和更多产品信息的获取请登陆网站：**www.promega.com**，或直接从Promega公司索取。

II. 产品组分及储存条件

产品	产品货号
PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130	DG4650

不得用于医学诊断。

包括：

- 25µl Fluorescein Matrix
- 25µl JOE Matrix

- 25µl TMR Matrix
- 25µl CXR Matrix
- 1.25ml Nuclease-Free Water

储存条件：

所有组分保存在-20℃。Matrix标准中的片段是光敏的，必须避光保存。建议这些组分和扩增后试剂一同保存，并且使用不同的加样器和试管架等。本产品只使用一次，然后将其丢弃。

III. 仪器准备及使用版本2.0或3.0数据收集软件进行光谱校正（ABI PRISM® 3100，3100-Avant，3130和3130xl型遗传分析仪）

需用户准备的材料：

- Hi-Di™甲酰胺（Applied Biosystems，货号：4311320）
- 加热块、水浴箱或热循环仪
- 冰
- 用于 3100 或 3130 的毛细管，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
- 防回吸加样吸头

III.A. Matrix样品制备

检测的灵敏度依仪器的不同而变化，下列推荐的 Matrix 样品稀释度可根据不同实验室所用的每一台 ABI PRISM® 3100,3100-*Avant*, 3130 或 3130*xl* 型遗传分析仪的灵敏度而进行优化。

1. **融化高浓度 Matrix 试剂。**使用前漩涡振荡 5－10 秒混匀，但是不要离心，避免将 DNA 片段沉淀至管底。
2. **高浓度片段的初始稀释：**在将荧光片段混合前，先用无核酸酶水按 1:10 稀释每个片段，漩涡振荡 5－10 秒混匀。

	JOE	FL	TMR	CXR
高浓度荧光标记物	5μl	5μl	5μl	5μl
Nuclease-Free Water	45μl	45μl	45μl	45μl

3. **片段混合（使用 1:10 稀释的各荧光标记片段）：**用步骤 2 的初始稀释液，按照下列方式混合。请先振荡混匀四色 Matrix 片段混合物，再加入到 Hi-Di™甲酰胺中。

混合组分	体积
Hi-Di™甲酰胺	480μl
JOE 初始稀释液	5.0μl
FL 初始稀释液	5.0μl
TMR 初始稀释液	5.0μl
CXR 初始稀释液	5.0μl

4. 在 ABI PRISM® 3100 和 3130*xl* 型遗传分析仪上，需要对 16 根毛细管进行 Matrix 检测（在 96 孔板上从 A1 到 H2），将“步骤 3”得到的混合液混匀后依次加入到样品板的 16 个孔中。在 ABI PRISM® 3100-*Avant* 和 3130 型遗传分析仪上，需要对 4 根毛细管进行 Matrix 检测（在 96 孔板上从 A1 到 D1），将混合液混匀后依次加入到样品板的 4 个孔中。
5. 将样品 95℃变性 3 分钟后迅速放置在冰上冷却 3 分钟。将准备好的样品板放至遗传分析仪上进行 Matrix 的生成。

III.B. 仪器准备

1. 如章节III.A中所述，制备Matrix样品。

   注意：您需要根据您实验室仪器的灵敏度，稀释Matrix样品、调整电泳进样时间或电泳电压。结果的峰值高度最低不能低于750RFU，在1,000–4,000RFU之间最为适宜。

2. 按照ABI PRISM® 3100,3100-*Avant*, 3130或3130*xl*型遗传分析仪的用户操作手册进行以下步骤的修改，运行光谱校正程序：

   a. 在Module Manager中选择New，在Type的下拉菜单中选择Spectral。然后在Template的下拉菜单中选择Spect36_POP4。并进行如下设置：

Inj. kV：	3
Inj. Secs：	5
Data Delay Time：	100
Run time：	800 seconds

   b. 在Instrument Protocols下的Protocol Manager中选择New，键入您对本程序的命名。在Type的下拉菜单中选择Spectral，在DyeSet的下拉菜单中选择F，在Array Length的下拉菜单中选择36。然后在Run Module的下拉菜单中选择您刚才创建的光谱校正程序。最后，在Edit Parameters中将lower condition设置为4.0、upper condition设置为12.0。点击OK，返回Protocol Manager界面，点击OK。

      注意：在生成光谱校正文件过程中，condition number（或C value）会随着仪器的变化而发生改变。当获得一个可以接受的光谱校正标准以后，在随后的校正中，先前设置的condition bounds范围就会变窄，以精确计算C值。

c. 在Plate Manager中，根据仪器使用说明创建一个新的平板记录。在显示的对话框中，Application下拉菜单中选择Spectral Calibration，plate type选择96-well。键入备注信息，命名平板，点击OK。

d. 在光谱校正平板编辑对话框中，键入相应样本的名称。在Instrument Protocol一栏中选择在步骤2.b中创建的程序。并且确保每个样本一栏中都包含了此信息。然后点击OK。

e. 按照仪器使用说明运行平板。

f. 程序运行结束后，在Event Log视窗中检查光谱运行状况。对于ABI PRISM® 3100和3130*xl*型遗传分析仪的16根毛细管，我们建议至少要有12根通过校正检测。对于ABI PRISM® 3100-*Avant*和3130型遗传分析仪的4根毛细管，我们建议至少要有3根通过校正检测。如果少于这个数目，必须重新进行光谱校正。

g. 当重新运行光谱校正时，同一板中的样品可以再进样几次。由于不同仪器检测灵敏度的差异，可能需要再次调整程序中的电泳电压和（或）进样时间。

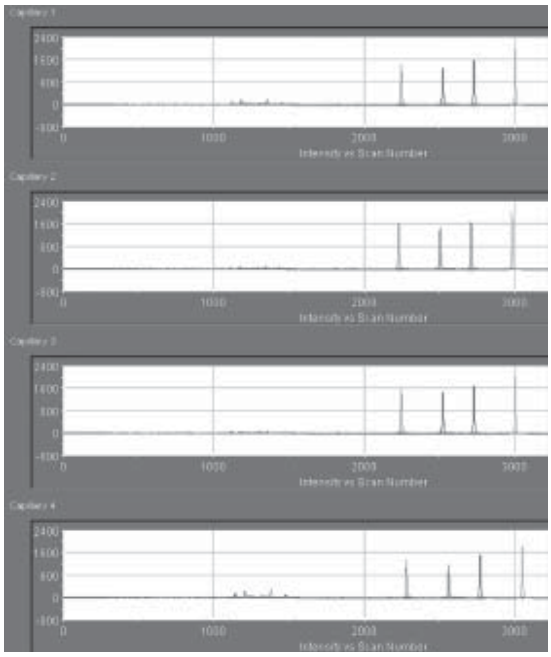

图1. PowerPlex® Matrix Standard 3100/3130在ABI PRISM® 3130型遗传分析仪上的运行结果

（使用版本3.0数据收集软件）

本图为在Capillaries Viewer中的4根毛细管的原始数据文件。依次为红、黄、蓝、绿峰。

IV. 在ABI PRISM® 3100或3100-Avant型遗传分析仪上使用版本1.0.1或1.1数据收集软件生成PowerPlex® 光谱校正文件

注意：为了成功的进行光谱校正，必须修改以下2个文件：第一个文件涉及运行模式，第二个文件涉及参数设置。这些指令仅应用于版本1.0.1和1.1数据收集软件。对于版本2.0或3.0数据软件的光谱校正说明参见章节III。

用户提供的材料：

- Hi-Di™甲酰胺（Applied Biosystems，货号：4311320）
- 加热块、水浴箱或热循环仪
- 冰
- 用于 3100 的毛细管矩阵，36cm
- 用于 3100 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
- 防回吸加样吸头

IV.A. 光谱校正运行模式

1. 打开ABI PRISM® 3100数据收集软件。
2. 在菜单Tools中打开module editor。点击calibration键，选择Spect36_POP4DefaultModule模式。
3. 进行如下设置：

Inj. kV：	3
Inj. Secs：	5
Data Delay Time：	100
Run time：	800 seconds

4. 点击Save As以新名称命名此模式（例如，Spect36_POP4PowerPlex），在使用PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130进行所有光谱校正时，将其作为原始运行模式。

   注意：由于不同仪器检测灵敏度的差异，根据不同的ABI PRISM® 3100或3100-*Avant*型遗传分析仪需要对进样时间（Inj. Secs）及电泳电压（Inj. kV）做相应的调整。

IV.B. 光谱校正参数设置

1. 将用户的光谱校正参数文件置于文件夹：My Computer/3100files (D:)\AppliedBio\Support Files\Data Collection Support Files\Calibration Data\Spectral Calibration\ParamFiles
2. 点击MtxStd{Genescan_SetF}，将会在“ Microsoft®记事本 ”程序中打开“ .par ”文件。
3. 调整condition Bounds范围到[4.0, 12.0]。
4. 点击File中的Save As，以新名称命名参数文件（例如，MtxStd{Genescan_SetZPowerPlex}.par）。在使用PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130进行所有光谱校正时，将其作为运行参数文件。

   注意：在生成光谱校正文件过程中，condition number（或C value）会随着仪器的变化而发生改变。当获得一个可以接受的光谱校正标准以后，在随后的校正中，先前设置的condition bounds范围就会变窄，以精确计算C值。

IV.C. Matrix样品制备

检测的灵敏度依仪器的不同而变化。您需要根据您实验室仪器的灵敏度，稀释Matrix样品、调整电泳进样时间或电泳电压。结果的峰值高度最低不能低于750RFU，在1,000–4,000RFU之间最为适宜。

1．融化浓缩高浓度的 Matrix 试剂。使用前漩涡振荡 5－10 秒混匀，但是不要离心，避免将 DNA 片段沉淀至管底。

2．高浓度片段的初始稀释：在将荧光片段混合前，先用无核酸酶水按 1:10 稀释每个片段，漩涡振荡 5－10 秒混匀

	JOE	FL	TMR	CXR
高浓度荧光标记物	5µl	5µl	5µl	5µl
Nuclease-Free Water	45µl	45µl	45µl	45µl

3．片段混合（使用 1:10 稀释的各荧光标记片段）：用步骤 2 的初始稀释液，按照下列方式混合。请先振荡混匀的四色 Matrix 片段混合物，再加入到 Hi-Di™甲酰胺中。

混合组分	体积
Hi-Di™甲酰胺	480µl
JOE 初始稀释液	5.0µl
FL 初始稀释液	5.0µl
TMR 初始稀释液	5.0µl
CXR 初始稀释液	5.0µl

4．在 ABI PRISM® 3100 和 3130xl 型遗传分析仪上，需要对 16 根毛细管进行

Matrix 检测（在 96 孔板上从 A1 到 H2），将“ 步骤 3 ”得到的混合液混匀后依次加入到样品板的 16 个孔中。在 ABI PRISM® 3100-Avant 和 3130 型遗传分析仪上，需要对 4 根毛细管进行 Matrix 检测（在 96 孔板上从 A1 到 D1），将混合液混匀后依次加入到样品板的 4 个孔中。

5．95℃变性样品 3 分钟后迅速放置在冰上冷却 3 分钟。将准备好的样品板放至 ABI PRISM 传分析仪上进行 Matrix 的生成。

IV.D. 仪器准备

这些指令仅应用于版本1.0.1和1.1数据收集软件

1. 按照仪器的使用手册说明来进行泵清洗，安装毛细管，进行光谱校正，以及向注射器中添加电泳胶。
2. 打开ABI PRISM® 3100数据收集软件。
3. 创建一个新的平板记录，命名平板，然后选择Spectral Calibration。在plate type选择96-well，点击Finish。
4. 完成已加样孔的样品表编辑，在Sample Name一栏中输入适当的信息。
5. 在dye set一栏的下拉菜单中，选择Z。
6. 在spectral run module一栏的下拉菜单中，选择Spect36_POP4PowerPlex（此程序在章节IV.A中创建）。
7. 在spectral parameters一栏的下拉菜单中，选择mtxStd{Genescan_SetZ PowerPlex}（此文件在章节IV. B中创建）。

完成的光谱校正平板样品表记录为以下设置：

Dye Set:：	Z
Spectral Run Module：	Spect36_POP4PowerPlex
Spectral Parameters：	MtxStd{Genescan_SetZPowerPlex}

8. 点击OK。数据收集软件中平板设置页（plate setup）的待测平板记录表（pending plate records）中将会出现新的平板记录。

IV.E. 光谱校正运行

1. 在待测平板记录表中，点击新设置的平板记录名称。
2. 当平板记录变亮，点击相应的自动取样器上装有进行光谱样品的平板图。
3. 当平板记录与平板连接，平板图会由黄色变为绿色，平板记录就从待测平板记录表变为连接平板记录表。此时，Run Instrument键被激活。
4. 点击工具栏的Run Instrument键，开始运行光谱校正。

IV.F. 光谱校正结果

1. 当光谱校正程序运行结束后，弹出Spectral Calibration Result视窗，显示哪些毛细管通过了校正。“ **.** ”表明校正成功，“ X ”表明校正失败。
2. 点击OK。
3. 查看光谱校正数据。在数据收集软件的工具菜单栏中选择“ Display Spectral Calibration ”。
4. 点击“ dye set ”键，在下拉菜单中选择Dye Set Z，然后点击OK。
5. Matrices for Dye Set Z视窗中会显示每根毛细管的光谱校正资料，使用滚动条可以查看16根毛细管的详细数据。对于PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130，毛细管必须满足下列条件才能通过校正：
   a. Q-value值必须大于0.95。
   b. Condition number （或C-value值）必须在4.0到12.0的范围内。
   c. 峰值在饱和状态下必须高于750RFU。
6. 点击OK关闭对话框。
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。

8. 当重新运行光谱校正时，同一板中的样品可以再进样几次。由于不同仪器检测灵敏度的差异，可能需要再次调整程序中的电泳电压和（或）进样时间。

V. 疑难解答

对于此处未提及的问题，请与您所在地的Promega办事处或分公司联系。

查询联系信息请登陆：**www.promega.com**。

E-mail：**Promega@promega.com.cn** 或 **Chinatech@promega.com.cn**。

现象	原因	注释及解决方案
通过光谱校正的毛细管少于12根	Matrix标准品过度稀释	Matrix标准品过度稀释会导致峰值过低。如果Matrix峰值小于1000RFU，减少本操作手册中章节III.A或IV.C中各样品片段的稀释度。
	Matrix标准品浓度过高	Matrix标准品峰值过强，会在其他色谱中出现拉升或消减现象，这会致使光谱校正失败。如果Matrix峰值过强（>6000RFU），提高本操作手册中章节III.C或IV.A中各样品片段的稀释度，并重新运行光谱校正。另外也可以缩短进样时间，以减少进样量。

VI. 相关产品

产品	型号	货号
PowerPlex® 16 System	100 reactions	DC6531
	400 reactions	DC6530
PowerPlex® Y System	50 reactions	DC6561
	200 reactions	DC6560
PowerPlex® 1.2 System	100 reactions	DC6101
PowerPlex® ES System	100 reactions	DC6731
	400 reactions	DC6730

不得用于医学诊断

配套组分

产品	型号	货号
Nuclease-Free Water	50ml	P1193

仅供实验室使用

(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.

Use of Promega's STR Systems requires performance of the polymerase chain reaction (PCR), which is the subject of European Pat. Nos. 201,184 and 200,362 and U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,965,188 and 4,683,202 owned by Hoffmann-La Roche*. Purchase of Promega's STR Systems does not include or provide a license with respect to these patents or any other PCRrelated patent owned by Hoffmann-La Roche or others. Users of Promega's STR Systems may, therefore, be required to obtain a patent license, depending on the country in which the systems are used. For more specific information on obtaining

a PCR license, please contact Hoffmann-La Roche.

*In the U.S., effective March 29, 2005, the above primary U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,965,188 and 4,683,202 will expire. In Europe, effective March 28, 2006, the above primary European Pat. Nos. 201,184 and 200,362 will expire.

(b) U.S. Pat. Nos. 6,238,863 and 6,767,703 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 and 6,221,598, 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.

© 2006 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GenePrint和PowerPlex是Promega公司的注册商标

ABI PRISM和MicroAmp是APPLERA公司的注册商标。Hi-Di和POP-4是APPLERA公司的商标。Microsoft是Microsoft公司的注册商标。