HuGen 21HS 荧光检测试剂盒

用户手册(v1.0)

无锡安科华捷生物科技有限公司

目 录

第一章 HuGen 21HS 荧光检测试剂盒简介 3

1.1、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒位点组成信息 3

1.2、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的特点 4

第二章 HuGen 21HS 荧光检测试剂盒组成成分 5

2.1、试剂盒组成 5

2.2、等位基因分型标准物(Allelic Ladder) 5

2.3、荧光分子量内标 (Marker SIZ-500) 6

第三章 DNA 模板的制备 7

3.1、滤纸、样本采集卡血斑或唾液斑 7

第四章 PCR 反应 8

4.1、PCR 反应构成 8

4.2、PCR 反应质量控制 8

4.3、PCR 仪器及循环参数 8

第五章 NA5Dye Matrix 和光谱校正(Spectral Calibration) 10

5.1、Data Collection 3.x 及以下版本创建 E5 Matrix 文件方法 10

5.2、3500 Data Collection 版本创建 NA5Dye Matrix 文件方法 12

第六章 PCR 产物的检测 14

6.1、PCR 产物电泳前准备 14

6.2、3130/3130xl 以及 3100/3100A 测序仪检测步骤(Data Collection4.x 版本) 14

6.3、3500 测序仪检测步骤 15

第七章 使用 GeneMapper ID-X 软件分析数据 22

7.1、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的 Panel 和 Bins 输入 22

第八章 低拷贝模板检测策略 26

8.1、低拷贝背景介绍 26

8.2、低拷贝模板检测策略 26

第九章 试剂盒常见问题及解答 27

附录 HuGen 21HS 人群数据统计表 30

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒遗传统计数据 30

第一章 HuGen 21HS 荧光检测试剂盒简介

1.1、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒位点组成信息

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒是一个多重短串联重复序列检测试剂盒，采用五色荧光技术（FAM 蓝色、HEX 绿色、SUM 黄色、LYN 红色用于标记位点，SIZ 橙色用于标记分子量内标），可以同时扩增和检测的基因座位点有 DYS391、SHGC-145653 、 D3S2457 、 D1S1608 、 D6S1010 、 CHLC.GATA142D12 、CHLC.GATA42F05、HUMUT7148、D2S437、D8S1039、Amelogenin、D5S2843、D4S3249、D14S586、D15S815、CHLC.GATA84D07、D1S1616、D4S2406、D2S1338、D5S2501、D12S1301。其组成位点信息见表 1：

表 1. HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的位点信息

基因座名称	核心重复序列	等位基因范围	荧光标记
DYS391	[TCTA]a	5-14	FAM
SHGC-145653	[TTAT]a	5-15	FAM
D3S2457	[TATC]a	7-13	FAM
D1S1608	[GATA]a	8-17.3	FAM
D6S1010	[ATCT]a	6-15	FAM
CHLC.GATA142D12	[GATA]a	8-18.2	FAM
CHLC.GATA42F05	[ATAG]a	7-15	HEX
HUMUT7148	[GTAT]a[CTAT]b	12-23	HEX
D2S437	[GATA]a	5-16	HEX
D8S1039	[TTTA]a[TTCA][TTTA]	10-16	HEX
Amelogenin	X,Y	X,Y	SUM
D5S2843	[ATAG]a	9-16	SUM
D4S3249	[GATA]a	5-14	SUM
D14S586	[TATC]a	8-15	SUM
D15S815	[ATAG]a	5-12	SUM
CHLC.GATA84D07	[TATC]a[TATG]0-1[TATC]b	9-16	SUM
D1S1616	[CCAT]a	8-13	LYN
D4S2406	[AGAT]a	8-17	LYN
D2S1338	[GGAA]a[GGCA]b	11-29	LYN
D5S2501	[TAGA]a	10-19	LYN
D12S1301	[AGAT]a	5-12	LYN

1.2、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的特点

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒提供 21 个基因座的分型数据，可以同步扩增 19 个常染色体 STR 和 Amelogenin 以及 1 个 Y-STR 位点，利用五色荧光技术、多重复合扩增方法对人基因组 DNA 中 STR 基因座的多态性进行检测，适用于以滤纸、FTA 卡和博坤卡为载体的血斑或唾液斑进行直接扩增而无需模板提取和纯化，同时也适用于提取的 DNA 模板。

1、该 21 个基因座的 STR 系统同时包含全新的 18 个常染色体 STR、1 个 CODIS 系统基因座 D2S1338、Amelogenin 和 1 个 Y-STR 基因座；

2、在包含 Amelogenin 性别位点用于鉴定性别的基础上，基于性别基因座 Amelogenin 中 Y 等位基因可能发生缺失，使得男性身份被错误认定，根据美国 FBI 建议，加入 1 个 Y-STR 基因座 DYS391 以便进行性别确认；

3、常染色体 STR 中还包含一个 CODIS 系统基因座 D2S1338，因此试剂盒体系与其他系统具有兼容性，有助于各实验室的数据共享和交流，同时又可作为现有 STR 复合扩增体系的有效补充工具；

4、全新的常染色体基因座联合其他试剂盒使用，为半同胞检测提供了更加细致且准确的检测窗口，满足新的技术规范和行业标准；

4、高性能的 PCR 缓冲系统和特异性的引物体系，可以显著提高受抑制的样本的扩增性能；对微量样本和混合物的极小量有效组分有更好表现的检出；

5、优化的热循环参数能在更短的时间内获得更好的扩增效果；

6、试剂盒位点的引物选择完全保守区域，避开了可能包含的高突变区域；

7、基因座覆盖的等位基因范围更大，减少了等位基因越界的风险；

第二章 HuGen 21HS 荧光检测试剂盒组成成分

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒包括扩增前试剂盒和扩增后试剂盒。可进行 100 次 PCR 扩增（25μL 反应体系）以及检测。

2.1、试剂盒组成

试剂盒	产品组分	主要成分
扩增前试剂盒	SUPER MIX	含 PCR 缓冲液、$MgCl_2$、dNTP 和酶
	Primers 21HS	含 21 个基因座 21 对引物
	Control DNA 9948	含 0.5ng/μL 9948 基因组 DNA
	sdH_2O	超纯水
扩增后试剂盒	21HS Allelic Ladder	含 21 个基因座等位基因（见附表）
	Marker SIZ-500	荧光分子量内标

注：

（1）收到试剂盒后请将扩增前试剂盒与扩增后试剂盒须分开保存于-20℃，试剂盒请不要反复冻融；

（2）NA5Dye Matrix 标准品只为初次使用该试剂盒者提供；

（3）Primers 21HS、21HS Allelic Ladder、Marker SIZ-500 和 NA5Dye Matrix 标准品须避光保存，请勿反复冻融；

（4）试剂使用前请轻微振荡，并短暂离心；

（5）本试剂盒有效期为 12 个月，生产日期及批号见产品包装；

（6）建议用量少的用户小管分装后冻存，本试剂盒仅供科研使用；

2.2、等位基因分型标准物(Allelic Ladder)

等位基因分型标准物的作用在于校正 PCR 产物在电泳过程中产生的迁移率偏差，以保证获得正确的待检样品基因型。其基因分型结果图谱见附图。阳性对照实验可以确认 PCR 反应是否成功，同时作为参考也能确保获得待检样品的准确基因型。HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的等位基因分型标准物及阳性对照 Control DNA 9948 基因型见表 2。

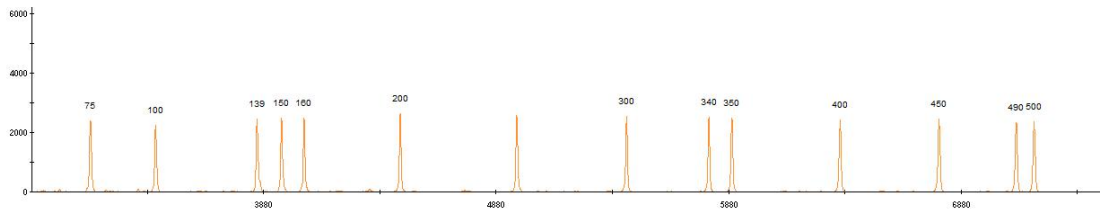
表 2 HuGen 21HS Allelic Ladder 及 9948 基因型信息

基因座	荧光标记	21HS Allelic Ladder	9948基因型
DYS391	FAM	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14	10
SHGC_145653	FAM	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15	8/9
D3S2457	FAM	7,8,9,10,11,12,13	10/10
D1S1608	FAM	8,9,10,11,12,12.3,13,13.3,14.3,15.3,16.3,17.3	11/12
D6S1010	FAM	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15	11/11
CHLC_GATA142D12	FAM	8,9,10,11,12,13,14,14.2,15,15.2,16.2,17.2,18.2	13/15.2
CHLC_GATA42F05	HEX	7,8,9,10,11,12,13,14,15	12/12
HUMUT7148	HEX	12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23	18/20
D2S437	HEX	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16	12/13
D8S1039	HEX	10,11,12,13,14,15,16	13/13
Amelogenin	SUM	X,Y	X/Y
D5S2843	SUM	9,10,11,12,13,14,15,16,	11/14
D4S3249	SUM	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14	11/12
D14S586	SUM	8,9,10,11,12,13,14,15	13/13
D15S815	SUM	5,6,7,8,9,10,11,12	10/11
CHLC_GATA84D07	SUM	9,10,11,12,13,14,15,16	10/14
D1S1616	LYN	8,9,10,11,12,13	10/10
D4S2406	LYN	8,9,10,11,12,13,14,15,16,17	11/11
D2S1338	LYN	11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29	23/23
D5S2501	LYN	10,11,12,13,14,15,16,17,18,19	13/15
D12S1301	LYN	5,6,7,8,9,10,11,12	7/10

2.3、荧光分子量内标 (Marker SIZ-500)

内标 Marker SIZ-500 包含 14 个 DNA 片段：75、100、139、150、160、200、250、300、340、350、400、450、490、500。

如下图所示：



第三章 DNA 模板的制备

3.1、滤纸、样本采集卡血斑或唾液斑

选取滤纸、样本采集卡上血斑或唾液斑涂痕处，用 1.0 或 1.2 mm 孔径打孔器打下一片，放于 96 孔板或 0.2 mL PCR 管中备用。

少数疑难样本采集卡样本（一般为新鲜的样本采集卡）可能存在个别位点的扩增效率问题，水洗可以适当改善此现象。水洗步骤如下：选取采集卡上血斑处，用 1.0 或 1.2 mm 孔径打孔器打下一片，放于 96 孔板或 0.2 mL PCR 管中，加入 150μL 超纯水或 1%Triton X-100，3000rpm 离心 5 分钟，室温浸泡过夜（或 37℃浸泡 6 小时，56℃浸泡 3 小时），第二天早上吸去液体（可选择 60℃干燥 10 min），备用。

第四章 PCR 反应

4.1、PCR 反应构成

组分	加样体积
DNA 模板	第三章中准备的直扩样本
SUPER MIX	10.0μL
Primers 21HS	5.0μL
sdH_2O	补足至 25.0μL

4.2、PCR 反应质量控制

1、确定扩增样品的数量，其中应包含阴性及阳性对照，另再增加 1-2 个反应以抵消操作误差。

2、如果模板 DNA 溶解于 TE 缓冲液中，所加模板 DNA 体积不得超过总反应体积的 20%。

3、反应体系中通常加入 0.1~1ng 模板 DNA。模板量过多时会导致扩增不平衡，模板量过少则会导致等位基因缺失。

4.3、PCR 仪器及循环参数

1、仪器

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒建议在具有 96 孔反应基座的标准 PCR 热循环仪上扩增。

2、热循环参数

选择下面推荐的程序进行热循环：

初始变性	热循环	终延伸	保 温
95℃ 1 分钟	**28 个循环：** 94℃ 15 秒，60℃ 50 秒，65℃ 70 秒	60℃ 10 分钟	4℃ 维持

注意：

1.因各地 PCR 仪性能不同，循环参数中的退火温度可适当调整，调整范围±2℃内，亦可根据模板 DNA 量和检测信号强度来调整热循环次数。

2.如以上所得产物需放置在热循环仪中超过18 个小时，须设置保温在4～25℃，具体温度和时间据各实验室情况而定。

3、PCR 产物的保存

保存时间小于 2 周，需于 2℃~6℃保存；保存时间大于 2 周，需于-15℃~-25℃保存。PCR 产物不需纯化，可直接与去离子甲酰胺、Marker SIZ-500 混合，变性后电泳。

第五章 NA5Dye Matrix 和光谱校正(Spectral Calibration)

光谱校正（Spectral Calibration）是为检测设备提供荧光类型识别，对于检测数据分析至关重要。HuGen 21HS 荧光检测试剂盒选择 E5 模式，配套的 NA5Dye Matrix 标准品包含 FAM、HEX、SUM、LYN 和 SIZ 标记的片段各一条。

注意：进行新的光谱校正前必须更换电泳缓冲液和水，并清洗存放水和电泳缓冲液的塑料槽与橡胶盖子，最好更换橡胶盖子。

5.1、Data Collection 3.x 及以下版本创建 E5 Matrix 文件方法

5.1.1、NA5Dye Matrix 标准品准备

Hi-Di 甲酰胺 160μL+NA5Dye Matrix 标准品 3.2μL→混匀→分装 10μL 至 96 孔板的 16 个孔（如 A1~H2）中→95℃变性 3 min，冰浴 3 min（也可先变性再分装）→3000rpm 离心 3min→置于遗传分析仪自动进样架上。

5.1.2、参数设置

1）、新建 Matrix Run Module

点击 Module Manager，点击 New，在其 Run Module Editor 界面，分别编辑如下内容：

A）、命名 Run Module：HuGen _Matrix；

B）、选择 Type：选择 SPECTRAL；

C）、选择 Template：选择 Spect36_POP4；

D）、参数修改：Injection_Voltage 为 1.2KV，Injection_Time 为 18s；

E）、点击 OK。

注意：进样电压和进样时间可根据检测峰高适当调整，以控制峰值在 1000-4000RFU 之间为最佳。

2）、新建 Matrix Instrument Protocol

点击 Protocol Manager，点击 New，在 Protocol Editor 界面，分别编辑如下

内容：

A）、命名 Protocol：HuGen _E5_Matrix；

B）、选择 Type：选择 SPECTRAL；

C）、选择 Dye Set：选择 E5；

D）、选择 Polymer：选择 POP4；

E）、选择 Array Length：36；

F）、选择 Chemistry：Matrix Standard；

G）、选择 Run Module：HuGen _Matrix；

H）、编辑其他参数：点击 Edit Param，修改如下：

a）、Matrix Condition Number Bounds：Lower：2；Upper：12；

b）、Locate Start Point：After Scan：2000；Before Scan：5000；

c）、点击 OK。

I）、点击 OK。

5.1.3、新建 Matrix 进样表

点击 Plate Manager，点击 New，打开 New Plate Dialog 界面，编辑如下内容：

A）、命名 Plate：HuGen _E5_Matrix；

B）、选择 Application：选择 Spectral Calibration；

C）、选择 Plate Type：选择 96-Well；

D）、编辑 Owner Name：实验者名字首字母缩写；

E）、编辑 Operator Name：操作者名字首字母缩写；

F）、点击 OK，弹出 Spectral Calibration Plate Editor 界面，编辑参数如下：

在样品对应位置（A1-H2）填入样品名（任意名称均可）→在 Instrument Protocol 栏选择 HuGen_E5_Matrix→点击 OK。

5.1.4、连接电泳

在 Run Scheduler 里的 Plate View 中查找名称为 HuGen_E5_Matrix 的进样表，选中后联接对应样品盘（A 或 B），此时 Run 按钮▶被激活，点击▶运行。

5.1.5、查看 E5 Matrix 文件

V1.x 版本中创建成功的 E5 Matrix 文件可按如下路径查看：Tool > Display Spectral Calibration > Dye Set > E5，此界面显示的即是刚建立成功的 E5 Matrix 文件。

V2.x 或 3.x 版本中创建成功的 Matrix 文件可以从 Spectral Viewer 观察，在 Dye Set 中选择 E5，界面显示的即是刚创建成功的 E5 Matrix 文件（可以点击 Rename 重新命名）。

如果重复建立了几次 E5 Matrix 文件后，需要激活之前的 E5 Matrix 文件，可以选择需激活的 E5 Matrix 文件，点击 Set 即可。

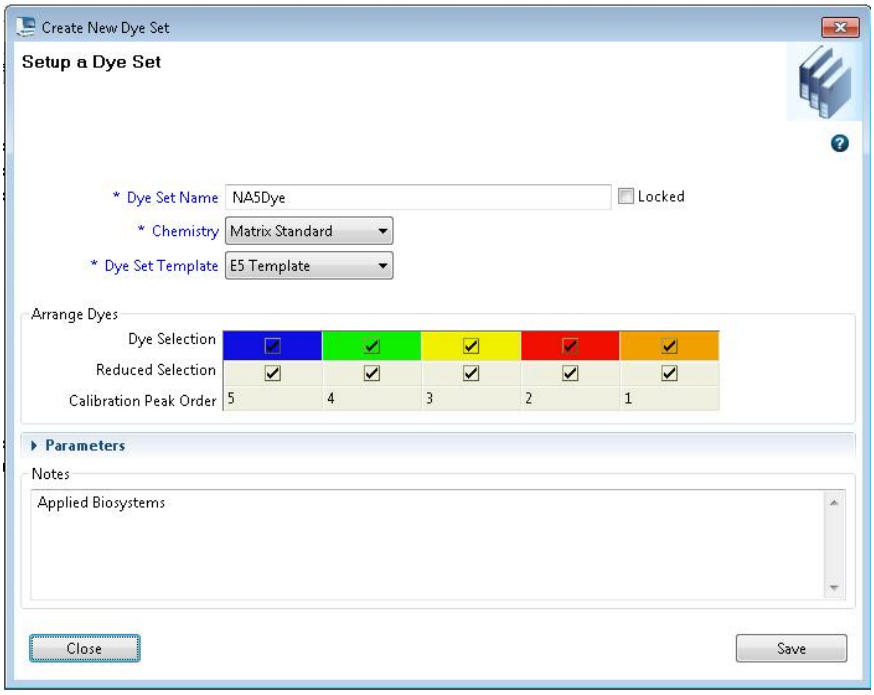
5.2、3500 Data Collection 版本创建 NA5Dye Matrix 文件方法

5.2.1、NA5Dye Matrix 标准品准备

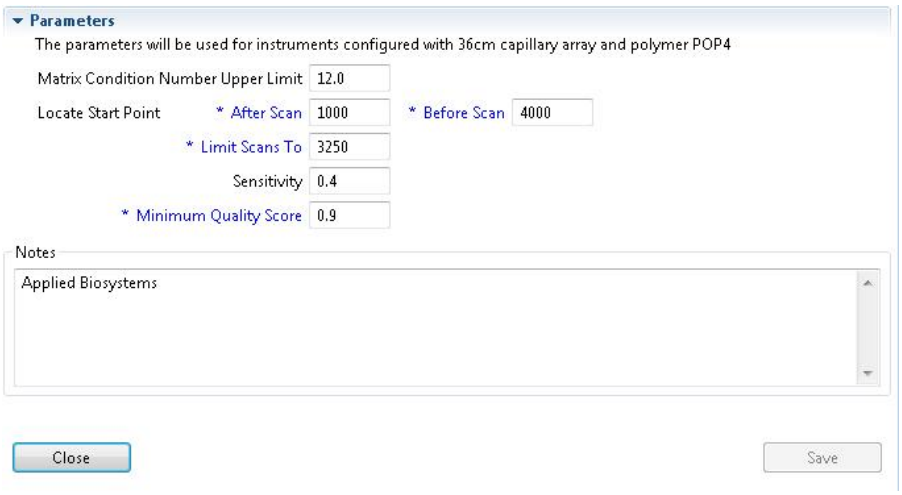
Hi-Di 甲酰胺 240μL+NA5Dye Matrix 标准品 4.8μL→混匀→分装 10μL 至 96 孔板的前三列各孔中→95℃变性 3 min，冰浴 3 min（也可先变性再分装）→3000rpm 离心 3min→置于遗传分析仪自动进样架上。

5.2.2、参数设置

3500 系列遗传分析仪光谱校正，不需要编写 protocol、run module 等软件栏目及其相应参数设置，直接按照仪器默认的参数进行即可，因此操作更为简单、快捷。Dyeset Set Name 中命名 NA5Dye，chemistry 选择 Matrix Standard，Dyset Set Template 选择 E5 Template。



对 Parameters 进行设置， C 值上限设置为 12。Locate Start Point 设置 1000-4000（具体根据实际电泳情况进行调整改变）



点击 Calibrate 下拉菜单中的 Spectral 按钮，按照图示选择各种参数点击 Start Run 即可进行光谱校正。如果光谱校正未达到仪器默认质量要求，仪器会自动重复跑样三次，并自动选择各次跑样中质量最好的通道作为此次光谱校正的最后结果。光谱校正时应观察实时原始数据，以便及时做出相应调整 Parameters 中的参数，确保最终结果。

第六章 PCR 产物的检测

6.1、PCR 产物电泳前准备

1、根据需电泳的样品数计算电泳混合液中 Hi-Di 去离子甲酰胺和分子量内标 Marker SIZ-500 的量，它们混合的比例如下表：

试剂	每个反应体积（μL）
Marker SIZ-500	0.3
Hi-Di 去离子甲酰胺	12

注意：

（1）、由于检测设备灵敏度不同，内标和去离子甲酰胺的比例可适当调整；

（2）、甲酰胺的质量非常重要，要求电导率<100 S/cm 的去离子甲酰胺，建议将甲酰胺分装并于－20℃冻存；

（3）、计算所需电泳混合液时应按照 N+2 来混合，以抵消吸样误差。

2、每管加入 12.3μL 上样混合物、1μL 扩增产物或 21HS Allelic Ladder，混匀，避免产生气泡。

注意：

（1）、空白孔处需加入 12.3μL 电泳混合液、Hi-Di 去离子甲酰胺或超纯水。

（2）、21HS Allelic Ladder 的加量可根据实际电泳情况适当调整，确保峰值在 200-2000RFU。如调整后峰值仍过高，孔中可加入 1μL 阴性对照再电泳。

3、加好样的 96 孔板盖紧硅胶盖，3000rpm 离心 1min，放置 PCR 仪上 95℃变性 3min，结束后立即冰浴 3min。

注意：虽然不经过变性也可进行检测，但当扩增产物较多时最好变性以消除二级结构的影响。

4、遗传分析仪电泳检测。

6.2、3130/3130xl 以及 3100/3100A 测序仪检测步骤(Data Collection4.x 版本)

1、启动 3130/3130xl Data Collection，新建一个 protocol：选择 protocol

manager；

点击“New”，命名 Name，如 HuGen-E5-STR；

Type：regular； Dye Set：E5；

Run Module ： HID Fragment Analysis36_POP4_1 或 Fragment Analysis 36_POP4_1；

2、打开 Plate Manager

点击 New，命名 Name：如 20170526；Application：GeneMapper-Generic；Plate Type：96-well；注：自动分析数据时选择 GeneMapper-Applied 模式）

点击“OK”，出现样品编辑表，编辑样品名称，选择 Results Group1、Instrument Protocol 1；

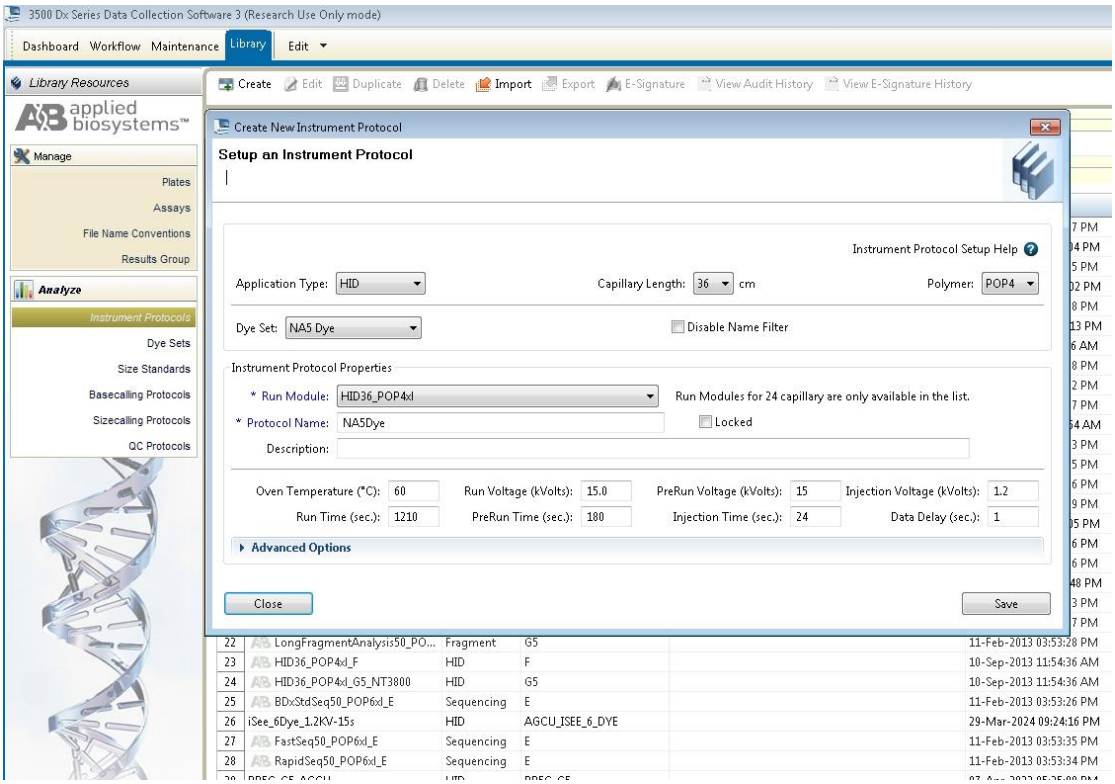
3、点击 3130 或 3130xl 栏

点击 Run Scheduler，点击 plate view，点击 find all 找到步骤 2 中已经命名编辑好的样品表，点击放置样品的 A 或者 B 盘联接激活按钮▲，点击按钮▲开始电泳。

6.3、3500 测序仪检测步骤

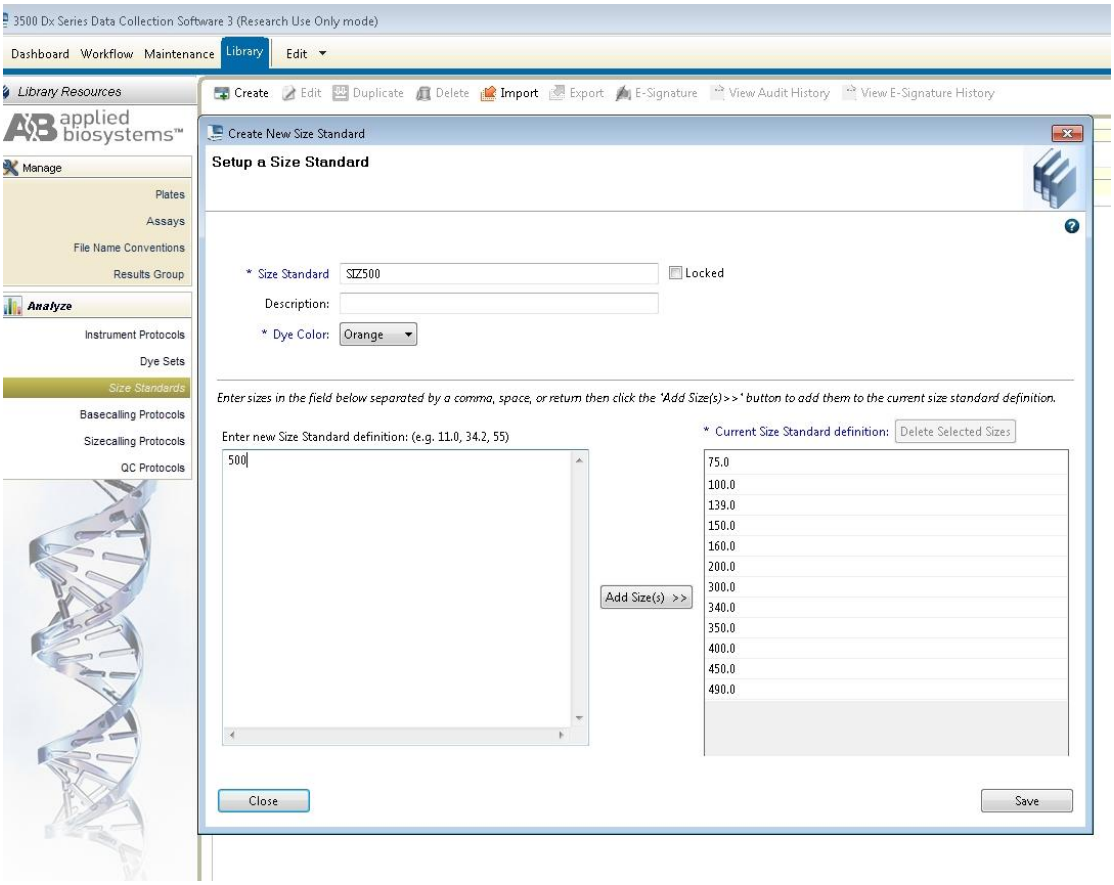
6.3.1、创建 Instrument Protocol

进入 library 界面，选择 Instrument Protocols 菜单，点击 Create。按下图所示选择或设置各个参数，设置完成后点击 Save 保存。注意将 Protocol Name 命名为“NA5Dye_STR”，进样电压设置为 1.2kv，进样时间可设置为 10~24 sec，Dye Set 选择已设置好的“NA5Dye”，其他参数设置请参照下图。



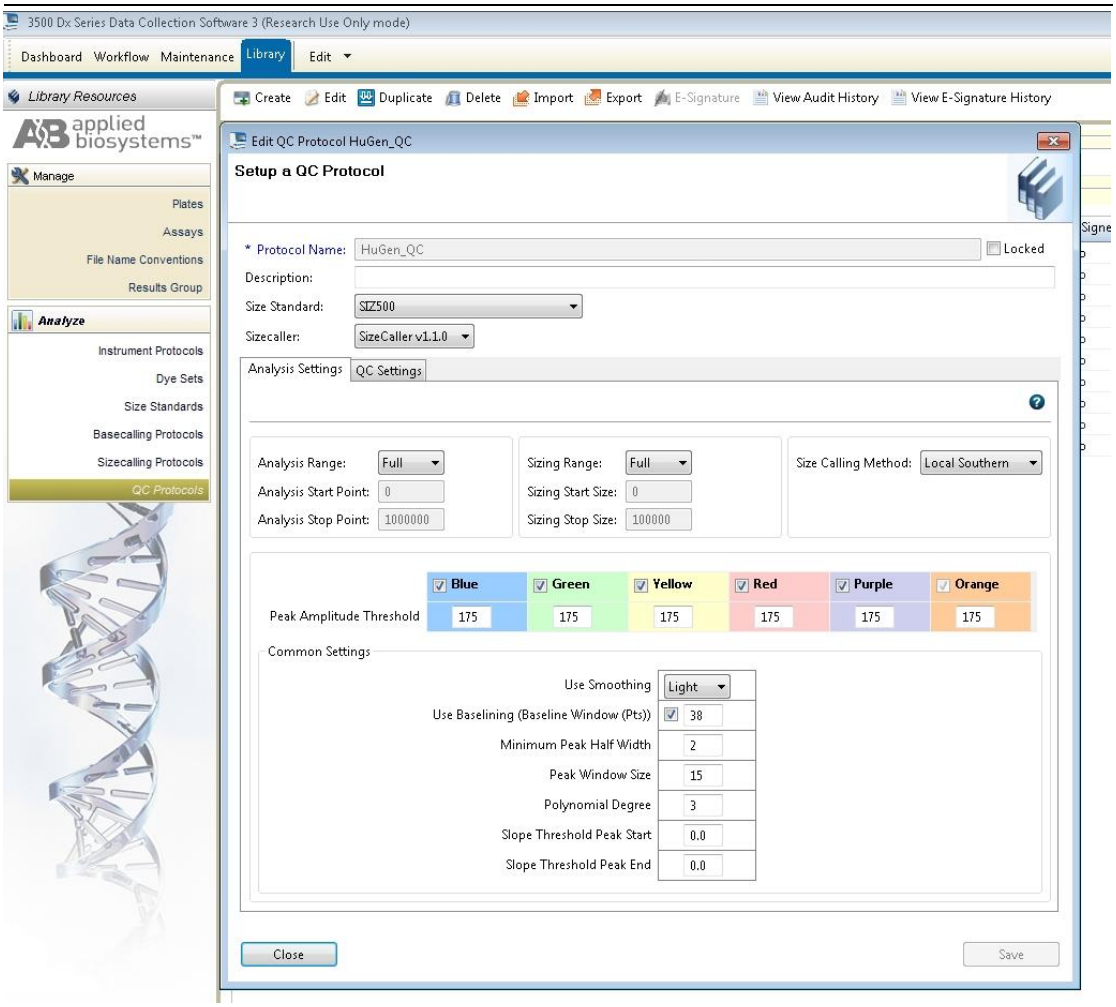
6.3.2、创建 Size Standard

进入 library 界面，选择 Size Standards 菜单，点击 Create。在 Size Standard 中输入“SIZ500”，Dye Color 下拉菜单中选择“Orange”，在左侧对话框中依次输入 75、100、139、150、160、200、300、340、350、400、450、490、500，每次输入结束后点击中间“Add Size”菜单即可将所输数字加入右侧对话框中。待全部输入结束后点击 Save 保存。



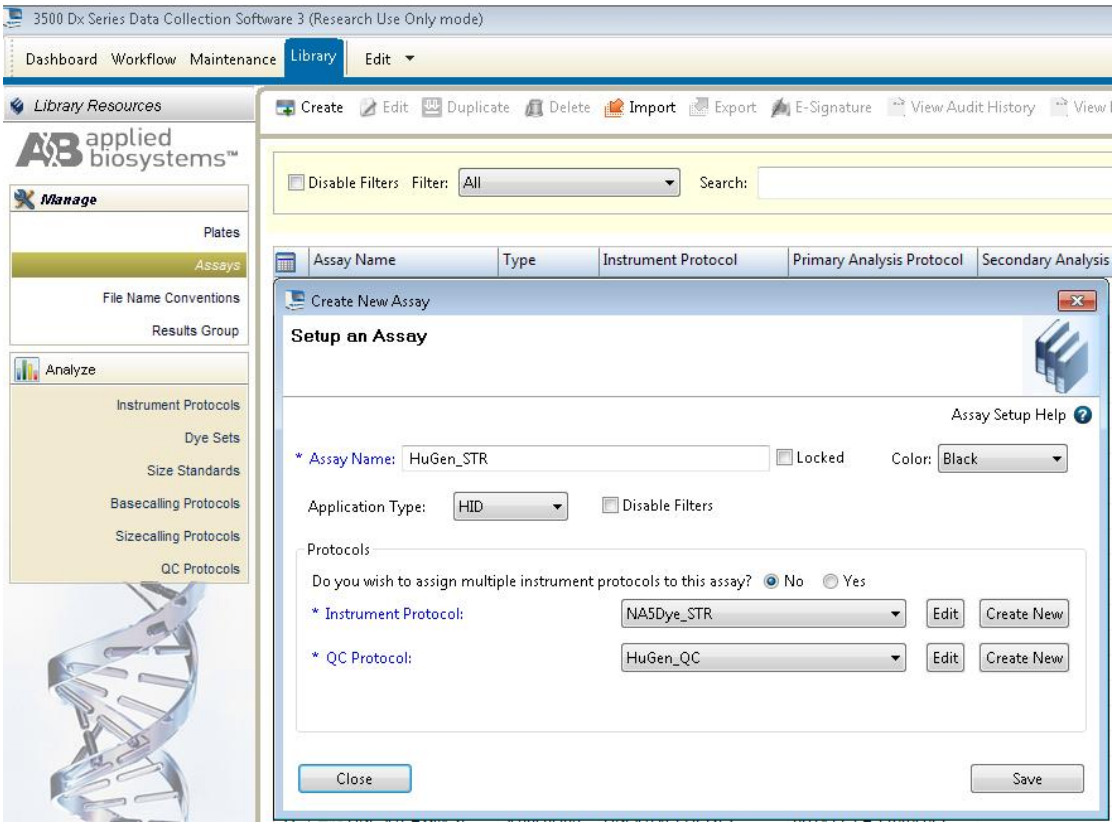
6.3.3、创建 QC Protocol

进入 library 界面，选择 QC Protocols 菜单，点击 Create。在 Protocol Name 中输入“HuGen_QC”，Size Standard 下拉菜单中选择已创建的“SIZ500”，将 Use Baselining 改为 38。其他参数均按下图所示进行设置，设置完成后点击 Save 保存。



6.3.4、创建 Assay

进入 library 界面，选择 Assays 菜单，点击 Create。在 Assay Name 中输入“HuGen_STR”，Application Type 下拉菜单中选择“HID”，Instrument Protocol 下拉菜单中选择创建的“NA5Dye_STR”，QC Protocol 下拉菜单中选择创建的“HuGen_QC”。待所有选项选择完成后点击 Save 保存。若第一步是从创建 Assay 开始，也可在该界面下点击“Create New”菜单，按照上文所述要求逐一创建新的 Instrument Protocol、QC Protocol 并将其保存至 Library 中，其效果与前面创建现在调用一样。

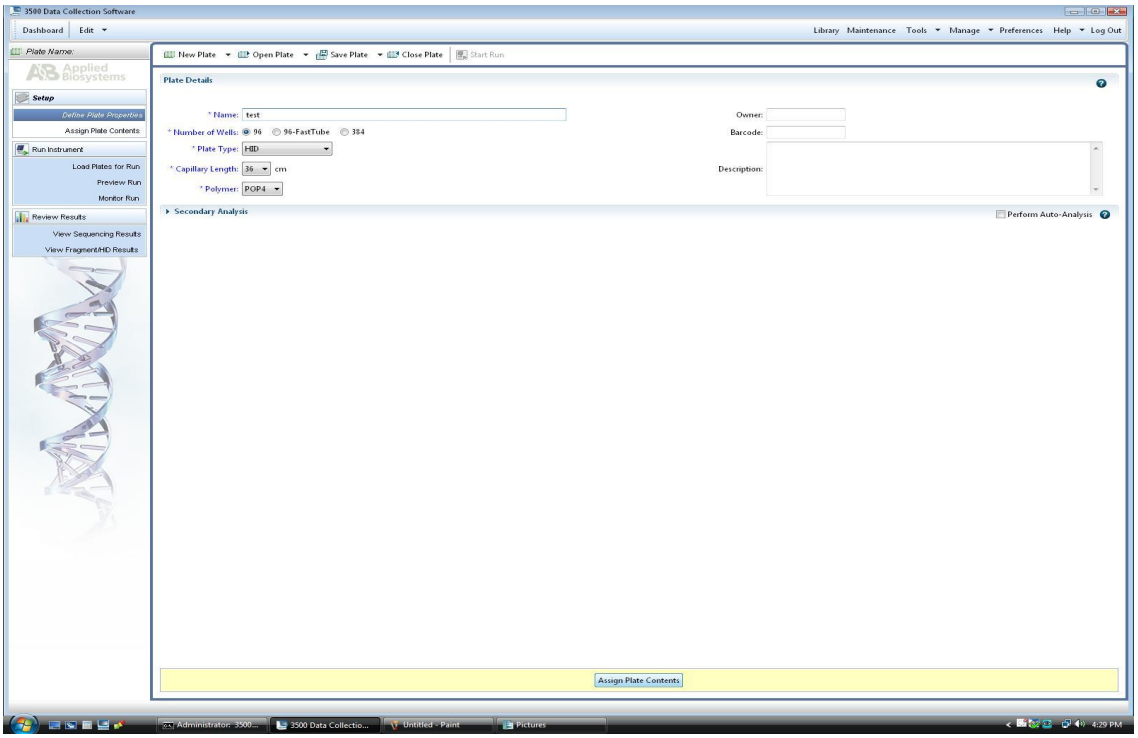


6.3.5、创建 File Name Convention

进入 library 界面，选择 File Name Conventions 菜单，点击 Create。在 Name 中输入“Sample name”，其他参数按下图进行设置，也可根据个人喜好进行更改。注意在 Select File Location 中选择 Custom File Location，可以先在硬盘新建文件夹，此处点击 Browse 进行选择。待所有设置完成后点击 Save 保存。

6.3.5、运行样品

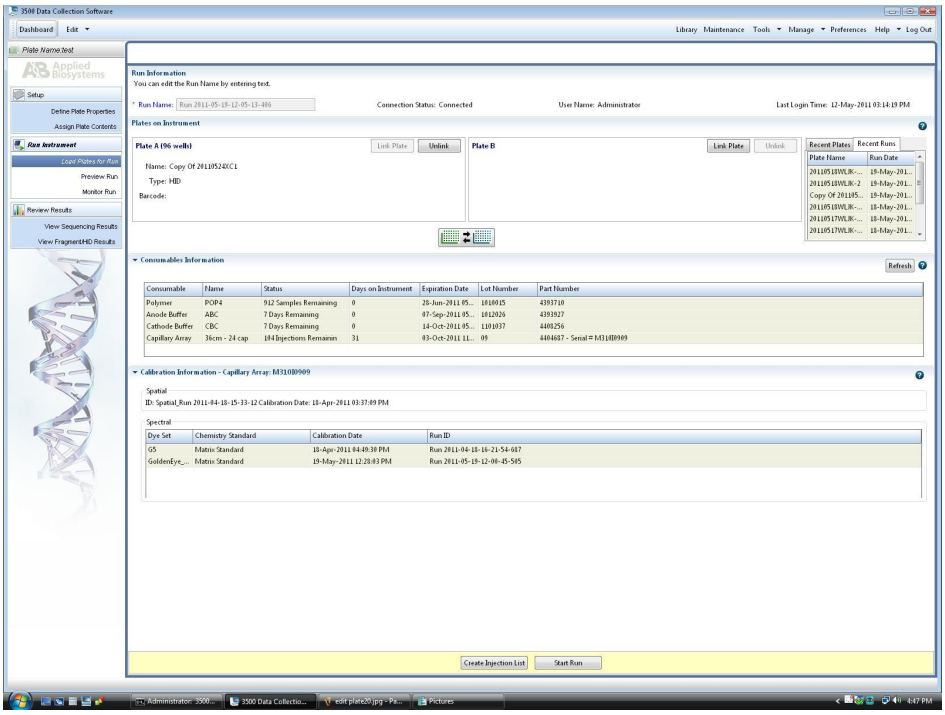
1、通过 Main workflow（ ）键进入 Set up 视窗，选择 Define Plate Properties 界面建立新的样品反应板，在 Name 栏输入样品板的名称，如 test，其余选项按图示进行设定。



2、输入样本名称，选择相应的 Assays，File Name Conventions，Results Groups：

样品名称：切换到 Assign Plate Contents 界面输入样品名称

3、运行样品板文件，切换到 Load Plates for Run 视图，从 Recent Plates 找到要电泳的反应板，点击 Link Plate（灰色表示反应板连接上，黑色则表示没有连接上），点击 Start Run 进行电泳。


3500 Data Collection Software
Dashboard
Edit
Library
Maintenance
Tools
Manage
Preferences
Help
Log Out
Plate Name test
Setup
Define Plate Properties
Assign Plate Contents
Run Instrument
Load Plates for Run
Preview Run
Monitor Run
Review Results
View Sequencing Results
View FragmentHID Results
Run Information
You can edit the Run Name by entering text.
Run Name:
Connection Status: Connected
User Name: Administrator
Last Login Time: 12-May-2011 03:14:19 PM
Plates on Instrument
Plate A (96 wells)
Link Plate
Unlink
Name: Copy Of 20110524XC1
Type: HID
Barcode:
Plate B
Link Plate
Unlink
Recent Plates
Recent Runs
Plate Name
Run Date
Consumables Information
Refresh
Consumable
Name
Status
Days on Instrument
Expiration Date
Lot Number
Part Number
Polymer
POP4
912 Samples Remaining
0
28-Jun-2011 05...
1010015
4393710
Anode Buffer
ABC
7 Days Remaining
0
07-Sep-2011 05...
1012026
4393927
Cathode Buffer
CBC
7 Days Remaining
0
14-Oct-2011 05...
1101037
4401256
Capillary Array
36cm - 24 cap
184 Injections Remainin
31
03-Oct-2011 11...
09
4404687 - Serial = M31080909
Calibration Information - Capillary Array: M31080909
Spatial
ID: Spatial_Run 2011-04-18-15-33-12 Calibration Date: 18-Apr-2011 03:37:09 PM
Spectral
Dye Set
Chemistry Standard
Calibration Date
Run ID
G5
Matrix Standard
18-Apr-2011 04:49:30 PM
Run 2011-04-18-16-21-54-667
GoldenEye_...
Matrix Standard
19-May-2011 12:28:03 PM
Run 2011-05-19-12-00-45-585
Create Injection List
Start Run
Administrator: 3500...
3500 Data Collectio...
edit plate20.jpg - Pa...
Pictures
4:47 PM

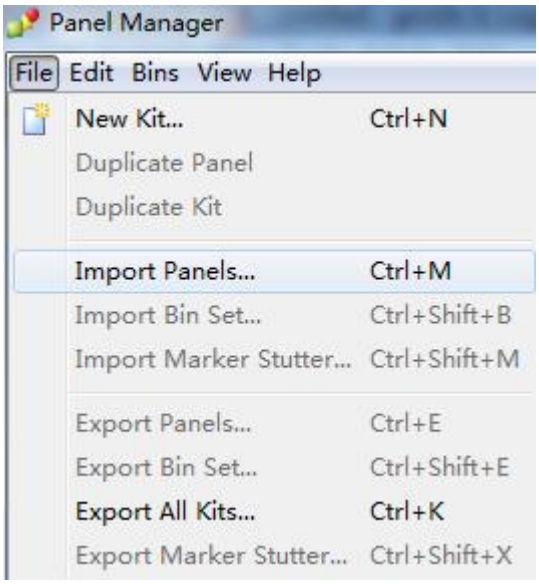
第七章 使用 GeneMapper ID-X 软件分析数据

7.1、HuGen 21HS 荧光检测试剂盒的 Panel 和 Bins 输入

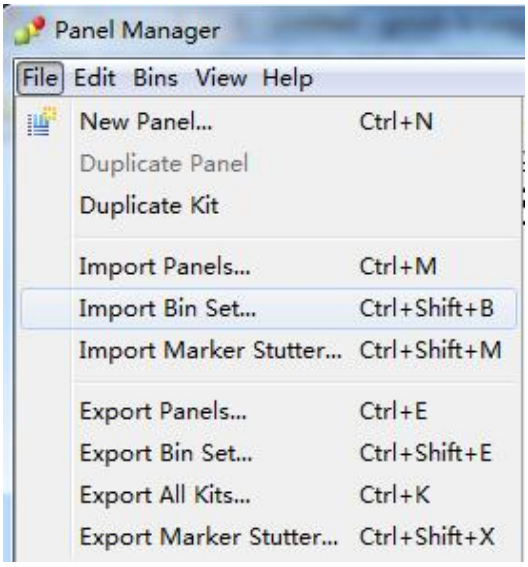
1、将提供的 HuGen_21HS_Kit_Panels.txt 和 HuGen_21HS_Kit_bins .txt 两个文件复制到 GeneMapper 的 Panels 文件夹中。

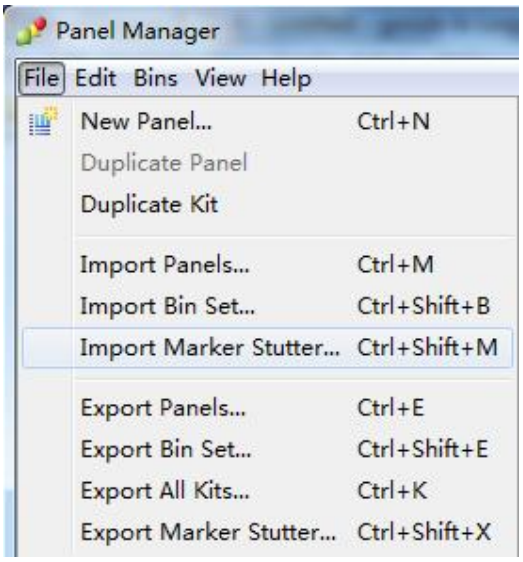
2、启动软件 GeneMapper ID-X，从 Tools 下拉栏中找到 Panel Manager 并点中，选择左下窗口中的 Panel Manager。

3、点击 File 菜单下的 Import Panels，弹出文件栏，找到 HuGen_21HS_Kit_Panels，点击输入该 Panels，选择左下窗口中的 Panel Manager 栏下的 HuGen_21HS_Kit_Panels。



4、点击 File 菜单下的 Import Bins，弹出文件栏，找到 HuGen_21HS_Kit_bins，点中输入该 Bins，点击 Apply 键，点击 OK 键。点击 File 菜单下的 Import Marker Stutter，弹出文件栏，找到 HuGen_21HS_Kit_stutter，点中输入该 Marker Stutter。点击 Apply 键，点击 OK 键。





5、点击 Tools 菜单下的 GeneMapper®ID-X Manager，弹出文件栏，选择弹出文件栏上的 Analysis Methods 标签，点击文件栏下方的 Import 按钮。在弹出窗口中找到 HuGen_21HS_Kit，点中输入该 Analysis Methods。点击 Done 键。至此，成功输入 HuGen 21HS 荧光检测系统分析所需文件。

7.2、数据分析

7.2.1、输入样品源数据

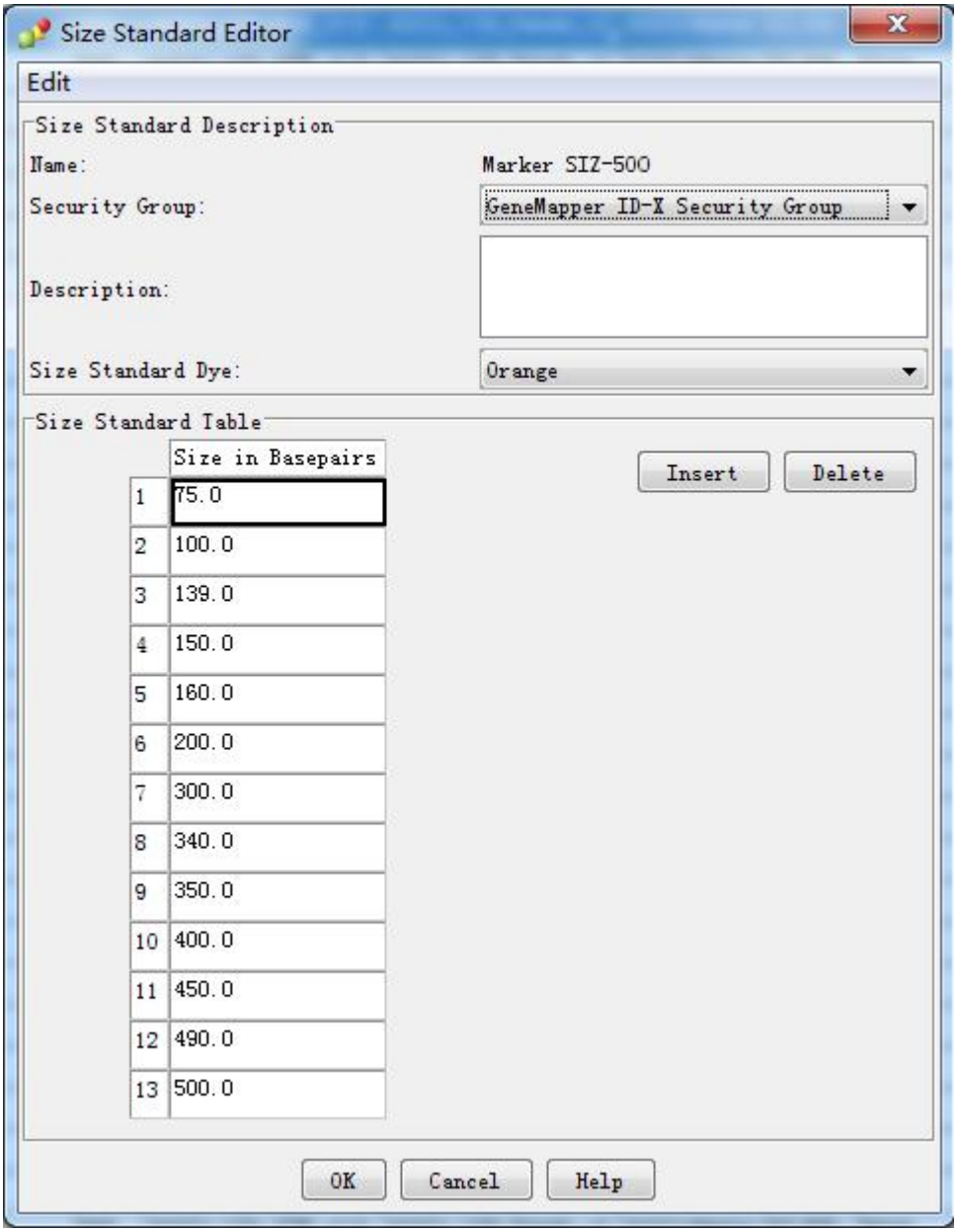
从 File 菜单栏中找到 Add Sample to Project 并点击，找到要分析的收集文件夹，点击 Add to List 后点击 Add 加入到分析界面。

7.2.2、选择试剂盒类型

在分析界面上，Panels 栏选中 HuGen_21HS_kit 荧光检测试剂盒并利用 Fill Down 向下填充。

7.2.3、定义 Size standard

选取 New Size Standard，弹出选择对话框，选择 Basic or Advanced 后，点击 OK，在弹出内标定义框中如下设置：Size Standard Dye：Orange；Size in Basepairs：75、100、139、150、160、200、300、340、350、400、450、490、500，点击 OK。之后，利用 Fill Down 操作向下填充。



7.2.4、定义 Analysis Method

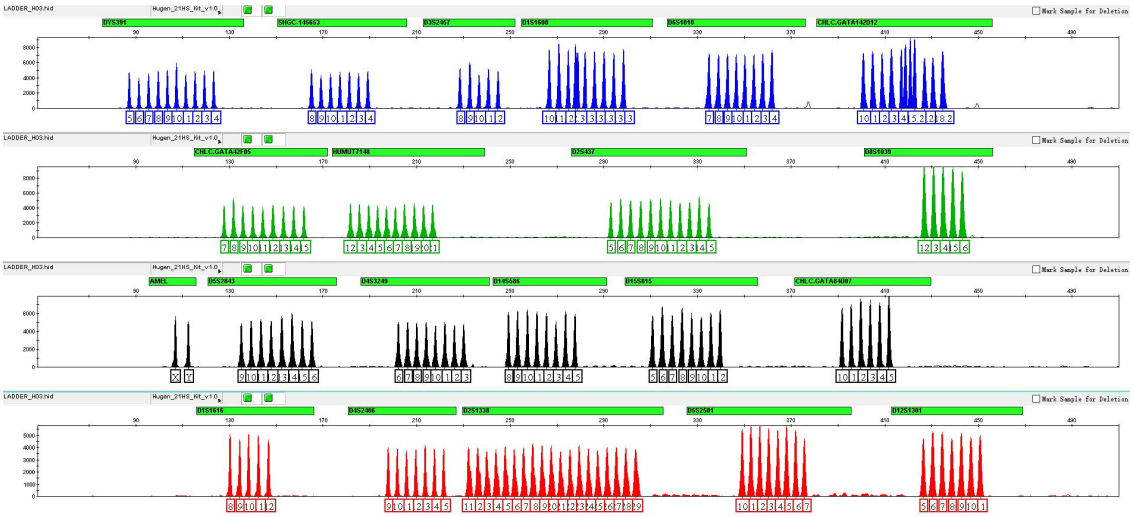
确定分析起始点，该起始点必须是分子量内标60之前的数据分析点，如2600。同时要观察内标的所有片段是否完全。

7.2.5、数据分析

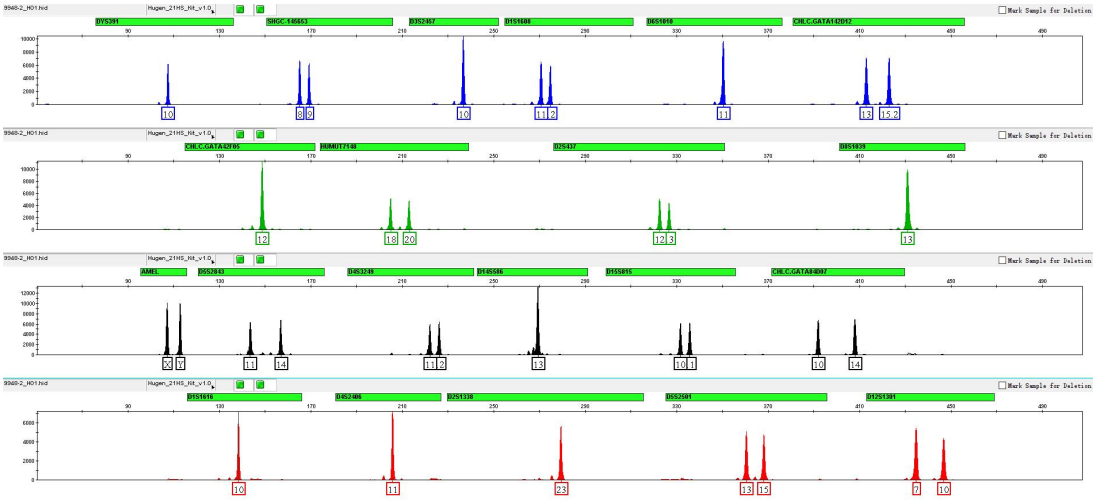
点击 new analysis method，在弹出的对话框中进行如下设置：HID、General Name：例如 HuGen System：选择 HuGen_21HS_Kit_bins_System_Bins，点击 OK 键。利用 Fill Down 操作向下填充，即可进行后续分析。

7.2.6、分型

判断的标准是阴性对照结果中不应有特异信号，Allelic Ladder 与 Control DNA 9948 的基因分型正确，如下图：



HuGen 21HS Allelic Ladder 分型结果



Control DNA 9948 分型结果

第八章 低拷贝模板检测策略

8.1、低拷贝背景介绍

基于实际样本检材中可能存在的低拷贝 DNA 现象。随着 DNA 检验鉴定技术的日益完善，检验的灵敏度也显著提高，微量 DNA 的检验（Low Copy Number，LCN）从微克级发展到纳克级以下的水平，小于 50pg DNA 也可成功分析，这大大提高了针对微量、降解 DNA 的分析能力。对微量 DNA 检验能力的提高，拓宽了 DNA 检验的范围，使得许多潜在的 DNA 检材也在同胞关系鉴定中发挥应有的价值。

8.2、低拷贝模板检测策略

8.2.1、提高循环数

关于低拷贝数扩增的情况，增加循环数可以进一步增加产量。循环数使得扩增产物明显提高，但对于检出率的提高是有限的。增加 PCR 扩增循环数的检测结果根据峰高来判读和解释, 这易引起结果的误判, 需引起高度重视。建议增加范围是 1~2 个循环数。

9.2.2、增加模板 DNA 的总量

设置 25μL 反应体系下，用模板替代水，即增加了 PCR 体系中模板的总量，这样提高扩增时模板 DNA 的相对浓度，有助于 DNA 信息的检出。在 25μL 检出率可达最佳状态。

第九章 试剂盒常见问题及解答

问题	可能原因	推荐解决方法
没有峰或峰很弱	模板 DNA 不纯	在 DNA 提取过程中会带进 PCR 的抑制物。
	模板 DNA 量不足	用推荐量的 DNA
	酶活性不足	用推荐量的 DNA 聚合酶，查看是否过期。
	扩增程序不正确	确证扩增程序
	高盐浓度或 pH 改变	DNA 体积不得超过总体积的 20%，样本中过多的钾、钠、镁离子或 EDTA 可影响 PCR pH 的改变也会影响 PCR。
	引物浓度太低	用推荐量的引物浓度,并充分混匀。
	样品上样前未变性	确保样品变性后立即上样
	毛细电泳进样差	重新进样，检查注射器 O 臂和激光源。
	去离子甲酰胺质量差	使用导电率小于 100 μ S/cm 的去离子甲酰胺。
有额外的杂峰出现	模板 DNA 被污染	使用带滤芯吸头及更换手套。
	样品未完全变性	充分变性，立即上样。
	背景	减少上样量或降低上样时间。
	与毛细管电泳（CE）相关的伪峰	微小电压变化或尿素结晶穿过扫描窗引起鬼峰，应重新进样。
	由污染产生的杂峰	有污染的水或缓冲液可在蓝色或绿色位点产生杂峰，使用无菌水，清洗缓冲液容器。
	DNA 过量	反应中模板 DNA 的量推荐在 1-2 ng 左右，大于 2 ng 时会产生杂峰。减少模板量或热循环数 10/20 或 10/18) 。
	Pull-up or bleed-through	当峰高 >2000 rfu 、产生的 matrix 不正确或质量不高时出现。提高峰域值 (例如 150-200 rfu) 或生成新的 matrix。
	由扩增产生的杂峰	通常比等位基因少 1-4 个碱基，上样量太大时峰变强。
等位基因阶梯与样本不符	去离子甲酰胺质量差	使用导电率小于 100 μ S/cm 的去离子甲酰胺。

	等位基因阶梯与引物不匹配	确保使用同一个试剂盒的等位基因阶梯与引物。
	由于 CE 柱温改变，不同样本的迁移会有所变化	在不同的时间进等位基因阶梯的样本。
峰高不平衡	DNA 过量	推荐使用 1-2 ng DNA，大于 2 ng 时在扩增过程中小位点会产生优势扩增。减少模板量或热循环数，使位点间峰高达到平衡。
	使用 FTA™ 纸	减少热循环数，使位点间峰达到平衡。
	DNA 样本降解	DNA 模板降解成小片段使大片段位点扩增产量降低。
	DNA 模板量不足	推荐使用 1-2 ng DNA。
	去离子甲酰胺质量差	使用导电率小于 100 μ S/cm 的去离子甲酰胺。
峰型变胖、变矮	Buffer 长时间不换，缓冲能力变差	更换阴、阳极 Buffer
	胶块或连接管中有气泡	每天都应检查胶块或连接管中有无气泡，及时排除
	毛细管堵塞	Fill Array 数次、空跑甲酰胺或去离子水
	毛细管使用次数过多	更换毛细管
分裂峰	电泳前样品未做变性处理	样品电泳前进行变性处理：95 ℃加热 3 min，立即冰浴 3min
		使用高质量的去离子甲酰胺，-20℃小份分装保存；勿使用过期变质的胶
电泳基线不平	电泳系统中存在荧光物质干扰	及时更换水和 Buffer
		Water Wash 冲洗 Block
		更换胶、更换毛细管
		养成良好的仪器维护习惯，保持电泳系统干净
出峰延迟	电泳迁移率变慢	更换 Buffer
		控制环境温度在 25 摄氏度左右
		设定 Oven 温度为 60 摄氏度
		保证胶的质量，Pop 胶放置在仪器上不要超过 1 周
出峰提前	电泳迁移率变快	更换 Buffer

		控制环境温度在 25 摄氏度左右
		设定 Oven 温度为 60 摄氏度
		保证胶的质量，Pop 胶放置在仪器上不要超过 1 周

附录　HuGen 21HS 人群数据统计表

HuGen 21HS 荧光检测试剂盒遗传统计数据

Allele	SHGC-145653	HUMUT7148	CHLC.GATA84D07	CHLC.GATA142D12	D12S1301
5	0.0033				0.0058
6					0.0767
7	0.0017			0.0008	0.2183
8	0.1772		0.0008	0.0008	0.0175
8.3					
9	0.1331		0.0033	0.0008	0.1200
10	0.1173		0.0715	0.0216	0.4392
10.1					
10.2					
10.3					
11	0.2463	0.0008	0.4917	0.3444	0.1200
11.1	0.0008				
11.2					
11.3					
12	0.2745	0.3869	0.2463	0.2978	0.0025
12.3					
13	0.0383	0.0033	0.0807	0.1198	
13.2				0.0025	
13.3					
14	0.0058	0.0008	0.0740	0.0125	
14.2				0.0058	
14.3					
15	0.0017		0.0308	0.0042	
15.2				0.1381	
15.3					
16		0.0025	0.0008		
16.2				0.0349	
16.3					
17		0.0516			
17.2				0.0141	
17.3					
18		0.2845			
18.2				0.0017	
19		0.1123			
20		0.0948			
21		0.0366			

22		0.0200			
23		0.0058			
24					
25					
26					
27					
28					
GD	0.8003	0.7439	0.6801	0.7578	0.7250
PIC	0.7703	0.7066	0.6391	0.7207	0.6884
PM	0.0702	0.1083	0.1407	0.0984	0.1199
PD	0.9298	0.8917	0.8593	0.9016	0.8801
Hobs	0.7770	0.7571	0.6606	0.7471	0.7550
PE	0.5571	0.5219	0.3699	0.5048	0.5184
TPI	2.2425	2.0582	1.4730	1.9770	2.0408
P Value	NA	NA	0.2668	0.0557	0.0905

续表 1

Allele	D14S586	D15S815	D1S1608	D1S1616	D2S1338	D2S437	D3S2457
5		0.3975				0.3136	
6		0.0208					
7		0.0008					0.0017
8	0.0042	0.0358	0.0008	0.0008			0.0025
8.3			0.0008				
9	0.0641	0.3150		0.0058		0.0033	0.0275
10	0.0216	0.1842	0.0116	0.3636		0.0067	0.5449
10.1							
10.2			0.0008				
10.3			0.0008				
11	0.2005	0.0400	0.1963	0.3236		0.0358	0.1672
11.1							
11.2	0.0025		0.0008				
11.3							
12	0.4517	0.0058	0.1963	0.2945		0.2097	0.2479
12.3			0.0108				
13	0.2055		0.0258	0.0108		0.2454	0.0083
13.2	0.0008						
13.3			0.0666				
14	0.0458		0.0008	0.0008		0.1323	
14.2							
14.3			0.2471				
15	0.0025					0.0516	
15.2							
15.3			0.2005				
16	0.0008				0.0116	0.0017	

16.2							
16.3			0.0383				
17					0.0691		
17.2							
17.3			0.0017				
18					0.1131		
18.2							
19					0.1705		
20					0.1131		
21					0.0208		
22					0.0424		
23					0.2171		
24					0.1597		
25					0.0591		
26					0.0200		
27					0.0025		
28					0.0008		
GD	0.7074	0.7061	0.8155	0.6768	0.8623	0.7766	0.6133
PIC	0.6659	0.6547	0.7889	0.6073	0.8466	0.7413	0.5556
PM	0.1247	0.1431	0.0592	0.1749	0.0343	0.0858	0.2122
PD	0.8753	0.8569	0.9408	0.8251	0.9657	0.9142	0.7878
Hobs	0.6639	0.7100	0.7987	0.6722	0.8586	0.7637	0.6323
PE	0.3746	0.4439	0.5966	0.3866	0.7118	0.5335	0.3314
TPI	1.4876	1.7241	2.4835	1.5254	3.5353	2.1162	1.3597
P Value	0.1817	0.1212	0.8899	0.5622	0.4712	0.6640	0.5974

续表 2

Allele	**D4S2406**	**D4S3249**	**D5S2501**	**D5S2843**	**D6S1010**	**D8S1039**	**CHLC.GATA42F05**
5		0.0025					
6		0.0849			0.0116		
7		0.0033					0.0033
8	0.0033	0.0025			0.0358		0.0008
8.3							
9	0.0017	0.0250		0.0092	0.0707	0.0008	0.0025
10	0.0017	0.1913	0.0067	0.0042	0.1531	0.1656	0.0757
10.1					0.0008		
10.2							
10.3							
11	0.1822	0.3344	0.0008	0.1398	0.3661	0.0067	0.1656
11.1							
11.2				0.0008			
11.3				0.0008			
12	0.4742	0.2862	0.0982	0.4185	0.3145	0.5607	0.3894

12.3							
13	0.2238	0.0682	0.1048	0.3228	0.0416	0.2296	0.2629
13.2							
13.3							
14	0.0807	0.0017	0.3960	0.0965	0.0050	0.0349	0.0907
14.2							
14.3							
15	0.0291		0.2512	0.0067	0.0008	0.0017	0.0092
15.2							
15.3							
16	0.0033		0.0982	0.0008			
16.2							
16.3							
17			0.0374				
17.2							
17.3							
18			0.0058				
18.2							
19			0.0008				
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
GD	0.6850	0.7578	0.7489	0.6923	0.7361	0.6047	0.7384
PIC	0.6391	0.7188	0.7138	0.6386	0.6939	0.5499	0.6977
PM	0.1464	0.0981	0.0991	0.1489	0.1136	0.2089	0.1068
PD	0.8536	0.9019	0.9009	0.8511	0.8864	0.7911	0.8932
Hobs	0.6905	0.7421	0.7421	0.7105	0.7438	0.6007	0.7088
PE	0.4137	0.4963	0.4963	0.4447	0.4992	0.2917	0.4420
TPI	1.6156	1.9387	1.9387	1.7270	1.9513	1.2521	1.7171
P Value	0.6428	0.6259	0.4894	0.2127	0.3549	0.9839	0.2948

n:某一基因座的所有等位基因总数　　P_i：等位基因频率

杂合度：$H(He)=1-(P_1^2+P_2^2+\cdots\cdots P_n^2)$

排除概率：$PE=H^2[1-(1-H)H^2]$

个人识别率：$PD=1-PM=1-2*(P_1^2+P_2^2+\cdots\cdots P_n^2)^2-(P_1^4+P_2^4+\cdots\cdots+P_i^4)$

匹配概率（符合概率）：PM= $P_I=X_1^2+X_2^2+\cdots\cdots+X_i^2$　Xi 为基因型频率

多态性信息含量：PIC=1-（$P_1^2+P_2^2+\cdots\cdots P_i^2$）-（$P_1^2+P_2^2+\cdots\cdots P_i^2$）^{2}+（$P_1^4+P_2^4+\cdots\cdots+P_i^4$）

父权指数 PI=1/2h==1/2*($P_1^2+P_2^2+\cdots\cdots P_i^2$)

表 2. 在中国汉族人群中遗传学统计参数（N=5500）

累积随机匹配概率（Combined Matching Probability）	7.86165×10^{-26}
累积非父排除率（Cumulative Probability of Exclusion）	0. 999999998202888

$CMP=PM_1*PM_2*\cdots\cdots PM_n$

$CPE=1-(1-PE_1)*(1-PE_2)\cdots$（$1-PE_n$）