

Microreader™ 20A ID System

使用说明书

1. 产品简介

Microreader™ 20A ID System采用6色荧光标记，多重扩增检测19个STR基因座和1个性别基因座，可用于法医学分析、亲缘关系检测以及科研等人类遗传鉴定方面。在13个CODIS 核心基因座的基础上，增加了Penta E、Penta D、D2S1338、D19S433、D12S391、D6S1043六个基因座，具有良好的数据库比对兼容性。

有关ISO18385标识的解释，本产品经过ISO18385认证的法医级产品。依据标准的范围，认证只包含了扩增试剂部分，而Size Standard、Matrix Standards、Allelic Ladder扩增后分析试剂不在本标准范围内。

2. 试剂储存

- 收到干冰或胶冰袋冷冻运输的试剂盒后，若暂时不用，请于-20℃以下长期保存；
- 试剂盒取出使用后，扩增组份试剂盒 4℃保存，并避免反复冻融；Master Mix I 于-20℃保存；
- 检测组份试剂盒请置于“检测室”4℃保存，避免反复冻融，并避免接触扩增组份试剂盒，以免造成污染。

3. 遗传分析仪

对于应用Applied Biosystems®3500/3500XL遗传分析仪，我们建议在使用前30分钟，预热炉温至60℃。设置仪器程序时，请参阅以下参数。必要时请参阅仪器用户手册了解更多详细信息。

表 1 Microreader™ 20A ID System 遗传分析仪参数设置：

遗传分析仪	运行模块	染料组	进样电压、进样时间
ABI®3500和3500XL型	HID36_POP4	J6	3 kV 10 sec*
ABI®3130和3130XL型	HIDFragmentAnalysis36_POP4	J6	3 kV 10 sec*
ABI®3730和3730XL型	FragmentAnalysis	J6	3 kV 10 sec*

*进样时间可以根据峰值的高度进行修改。建议修改范围为（2-24秒），以增加或减少所观察到的峰的高度。

4. PCR 扩增体系

配制 PCR 扩增体系前，请务必将完全融化后的 Master Mix I 和引物混合液漩涡震荡 10 秒钟，然后短暂离心。

表 2 Microreader™ 20A ID System 标准扩增体系

反应组份	25 μL 体系加入量
Microreader™2.5× Master Mix I	10 μL
Microreader™ 20A 5× Primer Mix	5 μL
模板 DNA (0.5~1ng)	2.5 uL
加 ddH ₂ O 至反应终体积	25 μL

*确定扩增反应的数目，包括阳性及阴性对照。配体系时增加 1-2 个反应体系以消除移液误差。

5. 扩增程序

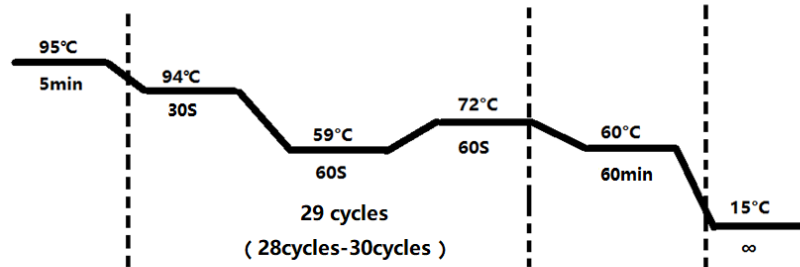


图 1 ABI 9700 热循环仪 PCR 反应程序设置

注意：（1）当使用 GeneAmp® PCR System9700 热循环仪时，程序必须在最大温度变化速率下运行(银或金镀银的热模板板)。热循环开始运行后可对温度变化速率进行设置。选择“Method”进入设置选项界面，选择“9600”作为速率设置模式，然后输入反应终体积；

（2）将扩增样品长时间地保存在 4°C或更高温度的环境中，可能会使产物降解。

6. 光谱校正（以 3500 型遗传分析仪为例）

（1）更换测序仪上陈旧的 POP4 胶和电泳 Buffer；

（2）取 4~12μL 6 色系统光谱校准试剂加到 200 μL 去离子甲酰胺中，震荡混匀，在 96 孔板的第一排 8 个孔中每孔分装 10 μL；

（3）95°C变性 3 分钟，立即放到冰上冷却 3 分钟；（此步重要，不可省略）；

（4）光谱校正电泳时，Dye Set 选择“J6”，具体参数可以根据仪器灵敏度进行调整，使最终检测峰高控制在 4000rfu-6000rfu 之间；

（5）为获得最好的校正效果，建议 Q 值>0.95，8 根毛细管通过 7 根以上，如果未能达到此标准，建议调整电泳参数，重新电泳。

注：甲酰胺的质量对实验很重要。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。质量不好的甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时与

DNA 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。甲酰胺为刺激性的致畸胎剂，应避免吸入以及直接接触皮肤。当操作此类试剂时，请仔细阅读警告标签，并请戴手套并佩戴防护眼镜。由于不同实验室的扩增及检测仪器的灵敏度不同，需要针对各个实验室仪器性能优化实验条件，包括 PCR 反应循环数和电泳进样时间。

7. 电泳检测

(1) 标准上样体系：

组分	体积 (μL)
甲酰胺	8.8~8.5
分子量内标 QD550	0.2~0.5
PCR 产物	0.5~1.5*

*根据产物浓度、测序仪的灵敏度适当增加或减少 PCR 产物量。推荐量为 $1\mu\text{L}$

(2) 批量上样体系：在 1ml 甲酰胺中加入 30~50 μL 分子量内标 QD550，混匀，分装到 96 孔板中，9 μL /孔；

(3) Allelic Ladder（等位基因阶梯）使用量：1 μL ；

(4) 创建新的 Instrument Protocol：参数设置 Application Type 选择 HID，Capillary Length 选择 36cm，Polymer 选择 POP4，Dye Sets 选择 MR_J6_Matrix，Run Module 选 HID36_POP4(xl)，Protocol Name 为 MR_J6_HID；Injection Time: 15 秒，Injection Voltage: 1.2kV，Run Time: 1210 seconds。点 Save 保存 Protocol。

注意：可以通过增加或者减少上样缓冲液中内标的加入量，来调节内标的峰值高度。不同实验室仪器的检测灵敏度存在差异，因此需要适当调节进样时间、进样电压或扩增产物与上样缓冲液的混合比例。在“Data Collection”软件中，可修改 Module Manager 中的电泳程序，来调节进样时间和电泳电压。若降低了进样时间和电压，也要相应降低橙色荧光检测峰高的阈值。

8. 数据分析

(1) 打开 Genemapper ID 软件，初次使用本试剂盒需要先导入 Panels&Bin，建立相应的 Analysis method，新建 Size Standard (QD550:70, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550)；

(2) 导入电泳数据，选择相应的 Panel、Analysis Method 和 Size standard 等分析参数，在“Sample Type”栏中，将 Ladder 的样本类型改为“Allelic Ladder”；开始分析数据。

附表 1 试剂盒组分表

试剂盒	组分名称	200 人份规格
扩增组分试剂盒	Microreader™ 20A 5×Primer Mix	500μL*2 支
	Control DNA F312 (2ng/uL)	25μL*1 支
	Nuclease-Free Water	1800ul*2 支
Taq 酶试剂盒	Microreader™ 2.5×Master Mix I	1000μL*2 支
检测组分试剂盒	Microreader™ 20A Allelic Ladder	40μL*1 支
	Microreader™ Size Standard QD550	150μL*2 支
	Microreader™ 6-Dye matrix Standards	25ul*1 支

附表 2 Microreader™ 20A ID System 基因分型信息

基因座	荧光标记	F312 基因型	9947A 基因型	M308 基因型
TPOX	FAM	8	8	8
D5S818	FAM	10	11	11/12
D21S11	FAM	30/30.2	30	31.2
D18S51	FAM	16/18	15/19	15/21
D3S1358	HEX	16/17	14/15	15/17
D13S317	HEX	11	11	11/14
D6S1043	HEX	11/19	12/18	11/19
Penta D	HEX	13	12	12
Amel	TAMRA	X	X	X/Y
VWA	TAMRA	19/20	17/18	15
D8S1179	TAMRA	14	13	13
Penta E	TAMRA	13/14	12/13	12/16
D19S433	ROX	13/16.2	14/15	14/15
D7S820	ROX	9/11	10/11	10/11
D2S1338	ROX	19/25	19/23	20
D16S539	ROX	11/12	11/12	9/11
CSF1PO	ROX	10/12	10/12	11/12
TH01	PUR	8/9.3	8/9.3	8
D12S391	PUR	21/23	18/20	20/22
FGA	PUR	22/24	23/24	21/23

苏州阅微基因技术有限公司
 苏州市高新区科技城锦峰路 8 号 15 号楼 312
[www. microread.com](http://www.microread.com)