

2021 年 6 月

补充操作方案

使用 Investigator[®] 26plex QS Kit 进行 DNA 直接扩增

本操作方案中介绍了通过使用 Investigator 26plex QS Kit (目录编号 382615、382617) 进行直接扩增来实现 STR 位点分析的方法。

据调查,使用本方案中所述的实验条件可获得最好的结果。然而,根据样本材料的不同,可能需要改变 PCR 循环数目,以便确保获得尽可能高的首次成功率。我们建议运行具有代表性的一批样本,以确定本方案中给出的循环数确实是最优的。如果所得电泳图中的信号过低,则应适当增加一个循环。如果所得电泳图中的信号过高,则应将循环数减少一个循环。

重要提示: 在开始执行本流程之前,请在 www.qiagen.com/HB-2681 上查阅《Investigator 26plex QS 手册》中的“安全信息”和“重要提示”章节。如需了解本方案中提及的其他化学品的安全信息,请查阅该产品的供应商提供的相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。

使用者需要自备的设备和试剂

工作中如需接触化学品,则必须穿着合适的实验工作服,并戴好一次性手套和护目镜。如需更多信息,请查阅该产品供应商提供的相关安全数据表 (Safety Data Sheet, SDS)。

针对所有操作方案所需的仪器设备及耗材

- Control DNA 9948 (5 ng/μl) (目录编号 386041)
- DNA Size Standard 24plex (BTO) (100) (目录编号 386035)
- DNA Size Standard 450 (BTO) (100) (目录编号 386045)
- Hi-Di™ Formamide, 25 ml (Applied Biosystems, 目录编号 4311320)
- 用于多毛细管分析仪的荧光矩阵标准物 BT6 (目录编号 386224)
- 移液管和移液吸头

- DNA 分析仪 *
 - 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 目录编号 4405673)
 - 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 目录编号 4405633)
- PCR 热循环仪*
 - QIAamplifier® 96
 - GeneAmp PCR System 9700
 - Veriti™ 96 孔热循环仪
 - ProFlex™ 96 孔 PCR 系统
 - Bio-Rad® PTC-200
 - Biometra UNO-Thermobloc
 - Eppendorf® Mastercycler® ep
- PCR 管或孔板
- PCR 管或孔板微型离心机

针对纸上的血液或口腔黏膜细胞的检测操作方案所需耗材

- UniCore Punch 1.2 mm (目录编号 WB100028) 和 Harris Micro Punch Replacement Cutting Mat, 6.0 x 8.0 inches (目录编号 WB100020)
 - Investigator STR GO! Punch Buffer (1000) 或 (200) (目录编号 386528 或 386526)
 - Investigator STR GO! Lysis Buffer (目录编号 386516)
- 提示：这仅适用于 BODE Buccal DNA Collector。

针对口腔黏膜拭子裂解物的检测操作方案所需耗材

- Investigator STR GO! Lysis Buffer (目录编号 386516)
- 2 ml 微量离心管
- 适配 2 ml 微量离心管的振荡器

*这不是供应商的完整列表，很多重要生物耗材供应商未包括在内。

操作方案：从 FTA 卡片或其他纸上血液样本开始的 PCR 扩增

本方案适用于使用 Investigator 26plex QS Kit 对 FTA 卡片或其他纸上打孔血液样本进行直接的 STR 基因座 PCR 扩增。

实验开始前重要注意事项

- 反应混合物应放置于独立区域，该区域应该与进行核酸样本制备和 PCR 产物分析 (post-PCR) 的区域有所隔离。
- 为了最大限度地降低交叉污染的风险，应使用带疏水滤芯的一次性移液吸头。

实验开始之前的准备事项

- 打开含有 PCR 组分的试剂管之前，短暂涡旋并离心试剂管，使内容物收集到管底。

流程步骤

1. 根据表 1（标准 PCR 体系）或表 2（减量 PCR 体系）制备反应预混液。

该预混液中含有 PCR 所需的所有组分。反应混合物的制备体积应比所有 PCR 检测量所需的体积多出 10%。检测数目中应包含阳性和阴性对照反应体系的数目。

表 1. 标准 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	7.5 μ l
引物混合液	2.5 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer	2.0 μ l
无核酸酶水	8.0 μ l
单个样本的总反应体积	20.0 μ l

表 2. 减量 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	3.75 μ l
引物混合液	1.25 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer*	2.0 μ l
无核酸酶水	3.0 μ l
单个样本的总反应体积	10.0 μ l

* 如果采用的是减量的 PCR 体积，则应确保总是使用 2 μ l 的 STR GO! Punch Buffer，无论预混液体积如何。所有其他试剂应按比例调整。对推荐方案做出的任何更改均必须由测试实验室进行验证。

2. 通过涡旋彻底混匀反应混合物，根据以上体系将反应液分装至 PCR 反应管或 PCR 板中。
3. 使用适合的工具（例如 UniCore Punch 1.2 mm）在样本斑的中央打孔，获得 1.2 mm 孔片样本。

重要提示：每次使用的孔片样本（圆片）数不能超过一个。

4. 向每个反应体系中加入一个 1.2 mm 的圆片。圆片转移后，不要混合反应体系。

5. 制备阳性和阴性对照品。

阳性对照品：使用 2 μ l Control DNA (5 ng/ μ l) (对照 DNA)。

注意：如果后续 PCR 中所得的信号过低或过高，您可能需要在确定了最佳 PCR 循环数之后，为您的实验室调整对照 DNA 的用量。请勿向阳性对照孔中添加空白孔片。

阴性对照品：不要向阴性对照中添加模板 DNA。不要向阴性对照 PCR 管或孔中添加空白圆片或水。

6. 对反应混合液进行短暂离心，确保孔片完全浸没到液体中。

7. 根据仪器制造商的说明，利用表 3 中给出的条件对 PCR 仪进行设置。

注意：如果采用铝加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Std Mode”（标准模式）；如采用银或银镀金加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Max Mode”（最大模式）。不可使用“9600 Emulation Mode”（9600 仿真模式）。

方案完成后，样本需立即进行电泳分析或在 -30 至 -15 $^{\circ}$ C 下避光保存。将 1 μ l PCR 产物直接加入到 12 μ l 含 Hi-Di Formamide（高度去离子甲酰胺）和分子量标准物的溶液中。按照《Investigator 26plex QS 手册》中所述启动分析仪运行。

表 3.用于 FTA 卡或其他纸上的血样扩增条件

温度	时间	循环数
96 $^{\circ}$ C*	12 分钟	-
96 $^{\circ}$ C	10 秒	3 个循环
64 $^{\circ}$ C	55 秒	
72 $^{\circ}$ C	5 秒	
96 $^{\circ}$ C	10 秒	22 个循环
61 $^{\circ}$ C	55 秒	
72 $^{\circ}$ C	5 秒	
68 $^{\circ}$ C	2 分钟	-
60 $^{\circ}$ C	2 分钟	-
10 $^{\circ}$ C	∞	-

* 采用热启动以激活 DNA 聚合酶。

操作方案：从 FTA 卡片或其他纸上口腔黏膜细胞样本开始的 PCR 扩增

本方案适用于使用 Investigator 26plex QS Kit 对 FTA 卡或其他孔片上的口腔黏膜细胞样本进行的 STR 基因座 PCR 扩增。

实验开始前重要注意事项

- 在使用 UniCore Punch 1.2 mm 采集口腔黏膜细胞时，应在白色区域打孔。这种颜色表示样本转移成功。
- 反应混合物应放置于独立区域，该区域应与进行核酸样本制备和 PCR 产物分析 (post-PCR) 的区域有所隔离。
- 为了最大限度地降低交叉污染的风险，应使用带疏水滤芯的一次性移液吸头。

实验开始之前的准备事项

- 打开含有 PCR 组分的试剂管之前，短暂涡旋并离心试剂管，使内容物收集到管底。

流程步骤

1. 根据表 4（标准 PCR 体系）或表 5（减量 PCR 体系）制备反应预混液。

该预混液中含有 PCR 所需的所有组分。反应混合物的制备体积应比所有 PCR 检测量所需的体积多出 10%。检测数目中应包含阳性和阴性对照反应体系的数目。

表 4. 标准 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	7.5 μ l
引物混合液	2.5 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer	2.0 μ l*
Nuclease-free water（无核酸酶水）	8.0 μ l
单个样本的总反应体积	20.0 μ l

* 如果采用的是减量的 PCR 体积，则应确保总是使用 2 μ l 的 STR GO! Punch Buffer，无论预混液体积如何。所有其他试剂应按比例调整。对推荐方案做出的任何更改均必须由测试实验室进行验证。

表 5. 减量 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	3.75 μ l
引物混合液	1.25 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer	2.0 μ l*
Nuclease-free water（无核酸酶水）	5.0 μ l
单个样本的总反应体积	12 μ l

* 如果采用的是减量的 PCR 体积，则应确保总是使用 2 μ l 的 STR GO! Punch Buffer，无论预混液体积如何。所有其他试剂应按比例调整。对推荐方案做出的任何更改均必须由测试实验室进行验证。

2. 通过涡旋彻底混匀反应混合物，根据以上体系将反应液分装至 PCR 反应管或 PCR 板中。
3. 使用适合的工具（例如 UniCore Punch 1.2 mm）在样本斑的中央打孔，获得 1.2 mm 孔片样本。

重要提示：每次使用的孔片样本（圆片）数不能超过一个。

4. 向每个反应体系中加入一个 1.2 mm 的圆片。圆片转移后，不要混合反应体系。

5. 制备阳性和阴性对照品。

阳性对照品：使用 1 μ l Control DNA (5 ng/ μ l)（对照 DNA）。

注意：如果后续 PCR 中所得的信号过低或过高，您可能需要在确定了最佳 PCR 循环数之后，为您的实验室调整对照 DNA 的用量。请勿向阳性对照孔中添加空白孔片。

阴性对照品：不要向阴性对照中添加模板 DNA。不要向阴性对照 PCR 管或孔中添加空白圆片或水。

6. 对反应混合液进行短暂离心，确保孔片完全浸没到液体中。

7. 根据仪器制造商的说明，利用表 6 中给出的条件对 PCR 仪进行设置。

注意：如果采用铝加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Std Mode”（标准模式）；如采用银或银镀金加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Max Mode”（最大模式）。不可使用“9600 Emulation Mode”（9600 仿真模式）。

方案完成后，样本需立即进行电泳分析或在 -30 至 -15 $^{\circ}$ C 下避光保存。将 1 μ l PCR 产物直接加入到 12 μ l 含 Hi-Di Formamide（高度去离子甲酰胺）和分子量标准物的溶液中。按照《Investigator 26plex QS 手册》中所述启动分析仪运行。

表 6. 推荐的 FTA 卡片或其他纸上口腔粘膜细胞样扩增条件

温度	时间	循环数
96 $^{\circ}$ C*	12 分钟	-
96 $^{\circ}$ C	10 秒	3 个循环
64 $^{\circ}$ C	55 秒	
72 $^{\circ}$ C	5 秒	
96 $^{\circ}$ C	10 秒	24 个循环
61 $^{\circ}$ C	55 秒	
72 $^{\circ}$ C	5 秒	
68 $^{\circ}$ C	2 分钟	-
60 $^{\circ}$ C	2 分钟	-
10 $^{\circ}$ C	∞	-

* 采用热启动以激活 DNA 聚合酶。

方案：从 BODE Buccal DNA Collector 上口腔粘膜细胞样本开始的 PCR 扩增

本方案适用于使用 Investigator 26plex QS Kit 对 BODE Buccal DNA Collector 上的口腔粘膜细胞样本进行的 STR 基因座 PCR 扩增。

实验前准备工作

- 反应混合物应放置于独立区域，该区域应与进行核酸样本制备和 PCR 产物分析 (post-PCR) 的区域有所隔离。
- 为了最大限度地降低交叉污染的风险，应使用带疏水滤芯的一次性移液吸头。

实验开始之前的准备事项

- 打开含有 PCR 组分的试剂管之前，短暂涡旋并离心试剂管，使内容物收集到管底。

流程步骤

1. 根据表 7（标准 PCR 反应体系）或表 8（减量 PCR 反应体系）制备反应预混液。

该预混液中含有 PCR 所需的所有组分。反应混合物的制备体积应比所有 PCR 检测量所需的体积多出 10%。检测数目中应包含阳性和阴性对照反应体系的数目。

表 7. 标准 PCR 反应体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	7.5 μ l
引物混合液	2.5 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer	2 μ l*
Nuclease-free water（无核酸酶水）	8 μ l
单个样本的总反应体积	20 μ l

* 如果采用的是减量的 PCR 体积，则应确保总是使用 2 μ l 的 STR GO! Punch Buffer，无论预混液体积如何。所有其他试剂应按比例调整。对推荐方案做出的任何更改均必须由测试实验室进行验证。

表 8. 减量 PCR 反应体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	3.75 μ l
引物混合液	1.25 μ l
Investigator STR GO! Punch Buffer	2 μ l*
Nuclease-free water（无核酸酶水）	3 μ l
单个样本的总反应体积	10 μ l

* 如果采用的是减量的 PCR 体积，则应确保总是使用 2 μ l 的 STR GO! Punch Buffer，无论预混液体积如何。所有其他试剂应按比例调整。对推荐方案做出的任何更改均必须由测试实验室进行验证。

2. 通过涡旋彻底混匀反应混合物。
3. 使用适合的工具（例如 UniCore Punch 1.2 mm）在样本斑的中央打孔，获得 1.2 mm 孔片样本。

重要提示：每次使用的孔片样本（圆片）数不能超过一个。

4. 将孔片样本转移到空 PCR 反应管的底部。
5. 每个样本加入 5 μ l Investigator STR GO! Lysis Buffer。
6. 保持反应管打开，在 95° C 下孵育 5 分钟。
7. 将预混液加入最终反应板/管中。
8. 制备阳性和阴性对照品。

阳性对照品：使用 1 μ l 对照品 DNA (5 ng/ μ l)。

提示：设置最佳 PCR 循环数后，如果信号太低或太高，可能需要调整对照品 DNA 的用量。请勿向阳性对照孔中添加空白孔片。

阴性对照品：请勿加入任何模板 DNA。不要向阴性对照 PCR 管或孔中添加空白圆片或水。

9. 对反应混合液进行短暂离心，确保孔片完全浸没到液体中。
10. 根据仪器制造商的说明，利用表 9 中给出的条件对 PCR 仪进行设置。

提示：如果采用铝加热模块的 GeneAmp PCR System 9700 热循环仪，请使用“Std Mode”（标准模式）；如采用 96 孔银加热模块或 96 孔银镀金加热模块，请使用“Max Mode”（最大模式）。不可使用“9600 Emulation Mode”（9600 仿真模式）。

方案完成后，样本需立即进行电泳分析或在 -30 至 -15° C 下避光保存。将 1 μ l PCR 产物直接加入到 12 μ l 含 Hi-Di Formamide（高度去离子甲酰胺）和分子量标准物的溶液中。按照《Investigator 26plex QS 手册》中所述启动分析仪运行。

表 9.推荐的 BODE Buccal DNA Collector 上口腔粘膜细胞样本扩增方案

温度	时间	循环数
96° C*	12 分钟	-
96° C	10 秒	3 个循环
64° C	55 秒	
72° C	5 秒	
96° C	10 秒	23 个循环
61° C	55 秒	
72° C	5 秒	
68° C	2 分钟	-
60° C	2 分钟	-
10° C	∞	-

* 采用热启动以激活 DNA 聚合酶。

操作方案：从口腔黏膜拭子裂解物开始的 PCR 扩增

本方案适用于使用 Investigator 26plex QS Kit 对口腔粘膜拭子原始裂解物进行直接的 STR 基因座 PCR 扩增。

实验开始前重要注意事项

- 反应混合物应放置于独立区域，该区域应该与进行核酸样本制备和 PCR 产物分析 (post-PCR) 的区域有所隔离。
- 为了最大限度地降低交叉污染的风险，应使用带疏水滤芯的一次性移液吸头。

实验开始之前的准备事项

- 打开含有 PCR 组分的试剂管之前，短暂涡旋并离心试剂管，使内容物收集到管底。

流程步骤

1. 将拭子放入 2 ml 微量离心管中。
小心地剪掉、掰掉或弹出拭子尾端。
2. 向样本中加入 500 µl STR GO! Lysis Buffer。
3. 将样本放入恒温混匀仪中，在 95° C 下孵育 5 分钟，同时以 1200 rpm 震荡。
4. 根据表 10（标准 PCR 体系）或表 11（减量 PCR 体系）制备反应预混液。
该预混液中含有 PCR 所需的所有组分。反应混合物的制备体积应比所有 PCR 检测量所需的体积多出 10%。检测数目中应包含阳性和阴性对照反应体系的数目。

表 10.标准 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	7.5 µl
引物混合液	2.5 µl
Nuclease-free water（无核酸酶水）	10.0 µl
单个样本的总反应体积	20.0 µl

表 11.减量 PCR 体系预混液配置方法

组分	单个反应体系的体积
Fast Reaction Mix 3.0	3.75 µl
引物混合液	1.25 µl
Nuclease-free water（无核酸酶水）	5.0 µl
单个样本的总反应体积	10.0 µl

5. 通过涡旋彻底混匀反应混合物，根据以上体系将反应液分装至 PCR 反应管或 PCR 板中。

6. 充分混匀拭子裂解物。将 2 μ l（对于标准反应体系）或 1 μ l（对于减量反应体系）拭子裂解物直接加入每个反应中。

7. 制备阳性和阴性对照品。

阳性对照品：使用 1 μ l Control DNA (5 ng/ μ l)（对照 DNA）。

注意：如果后续 PCR 中所得的信号过低或过高，您可能需要在确定了最佳 PCR 循环数之后，为您的实验室调整对照 DNA 的用量。

阴性对照品：使用空白拭子裂解物作为对照。

8. 根据仪器制造商的说明，利用表 12 中给出的条件对 PCR 仪进行设置。

注意：如果采用铝加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Std Mode”（标准模式）；如采用银或银镀金加热模块的 GeneAmp 9700 热循环仪，请使用“Max Mode”（最大模式）。不可使用“9600 Emulation Mode”（9600 仿真模式）。

方案完成后，样本需立即进行电泳分析或在 -30 至 -15° C 下避光保存。将 1 μ l PCR 产物直接加入到 12 μ l 含 Hi-Di Formamide（高度去离子甲酰胺）和分子量标准物的溶液中。按照《Investigator 26plex QS 手册》中所述启动分析仪运行。

表 12.推荐的口腔粘膜拭子裂解物扩增条件

温度	时间	循环数
96° C*	12 分钟	-
96° C	10 秒	3 个循环
64° C	55 秒	
72° C	5 秒	23 个循环
96° C	10 秒	
61° C	55 秒	
72° C	5 秒	-
68° C	2 分钟	
60° C	2 分钟	-
10° C	∞	-

* 采用热启动以激活 DNA 聚合酶。

故障排除

相关故障排除信息，请咨询《Investigator 26plex QS 手册》中的“故障排除指南”。

文档修订历史

日期	更改
02/2020	初次发布
06/2021	修订表 3、表 6 和表 12 中的循环条件。更改表 2 中每次反应的无核酸酶水体积。在“用户需准备的仪器和试剂”部分新增“Veriti 96 孔热循环仪”、“ProFlex 96 孔 PCR 系统”和“QIAamplifier 96”。新增“操作方案：从 BODE Buccal DNA Collector 上口腔粘膜细胞样本开始的 PCR 扩增”。编辑和版式更改。

有关设备许可的最新信息以及产品特定免责声明，请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒说明书或用户手册。QIAGEN 试剂盒说明书和用户手册可从 www.qiagen.com 或 QIAGEN 技术服务部以及您当地的经销商联系处取得。

商标：QIAGEN®、Sample to Insight®、Investigator®、QIAamplifier® (QIAGEN Group)；Biometra® [Biometra medizinische Analytik GmbH]；Bio-Rad® [Bio-Rad Laboratories, Inc.]；Eppendorf®、Mastercycler® [Eppendorf AG]；Applied Biosystems®、GeneAmp®、Hi-Di™、ProFlex™、Veriti™ (赛默飞世尔科技或其子公司)。本文中使用的注册名称、商标等，即便未专门标记，也不得视为不受法律保护。

06/2021 HB-2762-002 © 2021 QIAGEN, 保留所有权利。

