

Investigator[®] 26plex QS Kit 的开发验证

QIAGEN[®] Investigator 26plex QS Kit 旨在用于法医鉴定、人类身份确定、亲子鉴定等领域的分子生物学应用场景。该试剂盒可在法医案件中用于进行多重 PCR，专为快速、可靠地绘制源自血液、口腔拭子和法医学斑迹的 DNA 基因图谱而开发。

开发人员针对法医和亲子鉴定实验室中常见的各种样本类型和条件对 Investigator 26plex QS Kit 的性能进行了评估。

该验证研究基于欧洲法庭科学研究所联盟 (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI) 的推荐意见 (1) 以及 DNA 分析方法科学工作组 (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM) 的修订验证指南 (2)。相关检测采用法医 DNA 分析中的成熟方法，其并行扩增了 CODIS (DNA 联合索引系统) 核心基因座工作组、欧洲法庭科学研究所联盟 (European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI)、欧洲 DNA 分型工作组 (European DNA Profiling Group, EDNAP) 和中国国家基因库推荐的 24 个多态 STR 标记：D1S1656、D2S441、D2S1338、D3S1358、D5S818、D6S1043、D7S820、D8S1179、D10S1248、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D22S1045、CSF1PO、FGA、Penta D、Penta E、TH01、TPOX、vWA、DYS391、和性别特异性 Amelogenin (3)。这些遗传基因座的特性已在众多研究中由其他实验室进行了界定 (4 - 6)。Investigator 26plex QS Kit 的一个特殊之处在于，它包含内部 PCR 对照 (内质控 QS1 和 QS2)，从而可就 PCR 效率和 PCR 抑制因子的存在情况提供有用的信息。内质控包含于引物混合液中，可与多态 STR 标记并行扩增。有关内质控的更多信息，请参见《Investigator 26plex QS Kit 手册》。

开发人员确定了最佳的反应条件，并评估了改变这些条件可造成的影响。

他们以 MgCl₂ 的浓度为例，阐述了不同缓冲液组分的浓度带来的影响 (第 2 页)。开发人员调查了检测的稳健性——在不同的 PCR 循环条件下及使用一系列不同的热循环仪时的稳健性 (第 3-7 页)；分析了 PCR 循环数的增多或减少带来的影响 (第 4 页)；并通过扩增法医案件分析典型浓度范围内的已知浓度 DNA 进行了敏感性评估 (第 7 页)。

他们还针对法医案件中可能会遇到的具体问题——比如使用暴露于苛刻环境条件的样本时获得结果的能力——进行了研究调查：对添加了几种不同类型的抑制物的 DNA 样本或降解的 DNA 样本进行了测试 (第 9 页)。他们还使用非人类 DNA 进行了交叉反应评估 (第 13 页)；还对结果的可重复性进行了验证 (第 18 页)。

开发验证的结果

该验证研究在 QIAGEN 研发部门进行。所示的所有电泳图均在 Applied Biosystems® 3500™ Genetic Analyzer 或 Applied Biosystems 3500™ XL Genetic Analyzer 上生成。电泳采用的是《Investigator 26plex QS Kit 手册》中所述的标准条件。除非另有说明，扩增过程均采用 GeneAmp® PCR System 9700 和 96 孔镀金银块。数据分析采用 Applied Biosystems GeneMapper ID-X 软件 1.2 版或更高版本。

反应条件

反应条件经过优化，以求达到就敏感性、特异性和可重复性而言的最佳性能。这其中包括对所有关键缓冲液组分进行的优化。Fast Reaction Mix 3.0 的最终复合体系是一款稳健的缓冲液系统，可耐受单个缓冲液组分的浓度变化，从而使这些变化不至于降低总体扩增性能。

例如，不同浓度的 $MgCl_2$ ——最重要的缓冲液组分之一——被加入到含有 500 pg 对照 DNA 9948 的标准反应体系中进行评估（图 1）。当 $MgCl_2$ 浓度位于其最佳浓度的 $\pm 17\%$ 范围内时，该检测可给出稳健的结果。

在这些条件下，STR 标记扩增具有很好的平衡性，没有出现扩增丢失或非特异扩增。对于其他缓冲液组分（比如，热启动 DNA 聚合酶、dNTPs 和 BSA），也进行了类似的最佳浓度评估实验（相关数据未显示）。

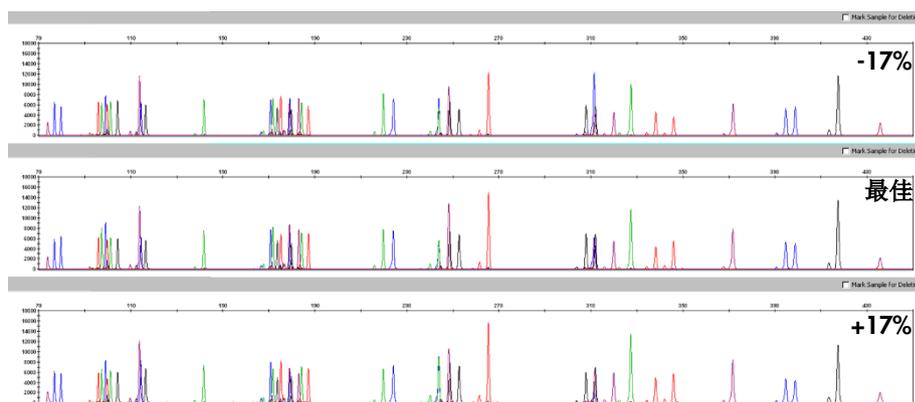


图 1. $MgCl_2$ 浓度的影响。向 Fast Reaction Buffer 3.0 (FRM 3.0) 中添加不同浓度的 $MgCl_2$ ：符合生产规格浓度、高于和低于生产规格浓度 17% 的浓度。图中显示的是一式四份的样本的代表性电泳图。

不同的 PCR 退火温度的影响

特异性、敏感性和稳健性在法医案件检测工作中至关重要，所有这些要素均受退火温度 (T_m) 的影响。鉴于实际 T_m 可能因循环条件而不同，开发人员对检测在 Investigator 26plex QS Kit 反应（60° C 下 30 个循环）最佳 T_m 附近的温度范围内进行了验证。

表 1. 推荐的针对所有 DNA 样本的标准循环方案

温度	时间	循环数
98° C	8 分钟	-
98° C	10 s	30 个循环
60° C	55 s	-
72° C	5 s	-
68° C	2 分钟	-
60° C	2 分钟	-
10° C	-	-

对 500 pg 对照 DNA 9948 进行的扩增采用了最佳退火温度 60° C - 4° C 和 +4° C 之间的退火温度。PCR 过程采用 Biometra TAdvanced 96/96 G 循环仪进行。反应体系采用（最佳退火温度）- 4° C 和 +4° C 之间的退火温度时，可生成完整的图谱。在 - 3° C 至 +1.5° C 范围内，可观察到良好的基因座间平衡。然而，标记的平均峰高在温度条件接近实际退火温度 60° C 时为最佳（图 2 和图 3）。在采用 100 RFU 作为阈值时，所测的反应体系中没有出现扩增丢失。没有观察到非特异性 PCR 产物。为了确保检测获得最佳性能，我们强烈建议对热循环仪进行定期校准。

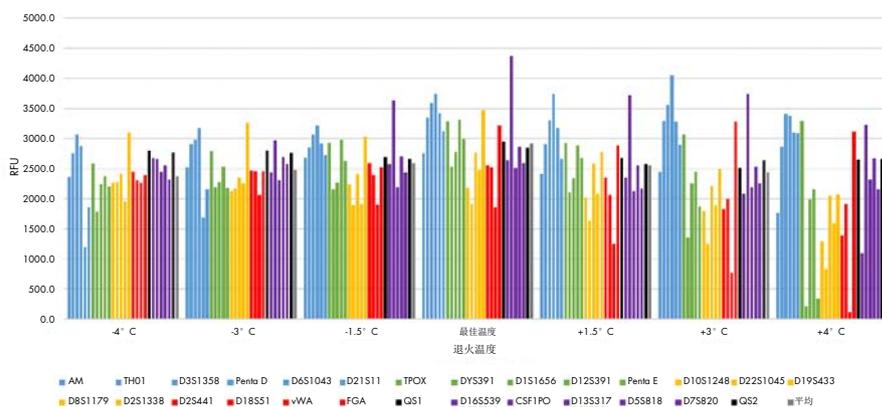


图 2. 不同的 PCR 退火温度的影响。在标准条件（30 个循环）下使用 Biometra TAdvanced 96/96 G 循环仪对 500 pg 对照 DNA 9948 进行了扩增。每个长条表示一式三份的样本的平均峰高。长条的颜色表示单个标记的荧光染料，灰色长条表示所有 STR 标记的平均值。

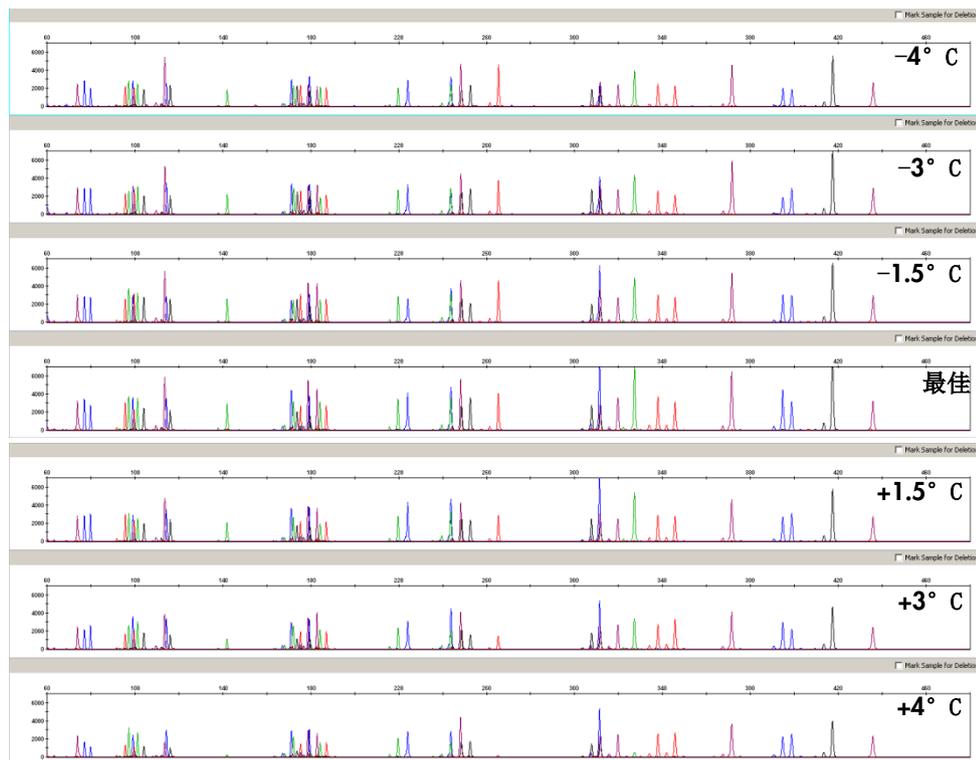


图 3. 不同的 PCR 退火温度。 开发人员使用 Biometra TAdvanced 96/96 G 循环仪对 500 pg 对照 DNA 9948 进行了扩增，以供进行分析。图中显示的是反应体系采用 -4°C 和 $+4^{\circ}\text{C}$ 之间的退火温度的代表性电泳图。请注意，y 轴经过缩放以便以最佳比例显示图谱。

不同循环数的影响

人们可改变 PCR 循环的数目以便使反应条件适应不同的 DNA 模板浓度。当使用的样本中的 DNA 拷贝数较低时，可增加循环数，以增强扩增信号；而当 DNA 样本足够时（比如对于数据库样本），则可减少循环数，以加快操作方案的执行速度。

对于含有 32、16 或 8 pg 对照 DNA 9948 的反应体系，开发人员将循环数目增加至 32 或 34，且将分型的等位基因的数目及峰高与标准 30 个循环操作方案下的结果进行了对比（图 4）。与预期一致，扩增产物的信号强度随循环数目的增加而增强。然而，需要注意的是，对于模板 DNA 含量低的样本，将总循环数目增加到 30 以上并不一定可获得更多信息。此外，由于存在随机效应，无论循环数目是否增多，对于低拷贝数样本（模板 DNA 等于或少于 100 pg），通常而言，都可能会观察到峰高不平衡的加重或扩增丢失的增多。在该实验中，采用更多的 PCR 循环数时，由于存在随机效应，等位基因分型阈值为 50 RFU 时的等位基因丢失数目并没有显著减少（图 4）。请注意，毛细管电泳仪的敏感性 & 检测的阈值设定对于增多的循环数相关评估结果会造成重大影响。因此，此类操作方案的变动必须由各实验室采用他们自己的仪器和分析方法进行评估。改变毛细管电泳仪的进样时间或进行 post-PCR 纯化（例如，QIAGEN MinElute® PCR Purification Kit）是增加敏感性的可选替代方法。

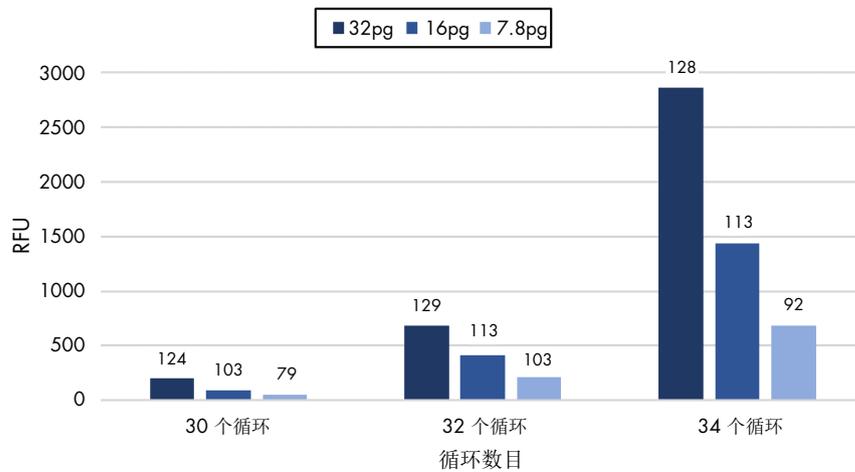


图 4. 不同循环数目对峰高均值和分型的等位基因数目的影响。如图所示，实验中采用了不同量的对照 DNA 9948 作为模板。样本按照一式三份进行处理，并计算出检出的 PCR 产物的数目（由上文中的长条上方数字表示；预期有 132 个 PCR 产物）及峰高（柱高）。检测阈值采用 50 RFU。

具体而言，对于可提取到大量 DNA 的参照样本——比如口腔粘膜拭子，可采用更少的循环数，以便精简实验室工作流。在这里，对于含有 2.5 ng 或 10 ng 模板 DNA 的反应体系，循环数被缩减至 24、26 或 28（图 5）。与预期一致，所有反应体系的扩增都很稳健，且在采用 50 RFU 作为等位基因分型阈值时，都产生了完整的图谱。然而，对于采用 28 个循环，且使用 10 ng 模板 DNA 的扩增体系，当向分析体系中加入没有预稀释的 PCR 产物时，可观察到拔高的峰形。下一页的图 6 是一个采用了 24 个循环和 2.5 ng 模板 DNA 的扩增示例。请注意，当循环数目缩减至 24 个循环以下时，内质控 QS1 和 QS2 的峰高会降低，且可能会低至阈值以下。内质控的模板数量是针对 24 或以上的循环数目而优化的。因此，当循环数在 24 或以上时，将可根据 QS 信号了解是否存在 PCR 抑制或模板 DNA 降解。

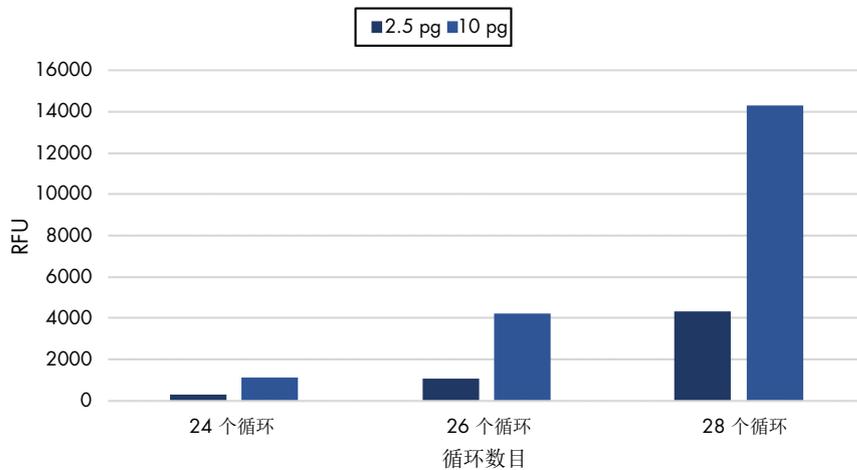


图 5. 循环数目的减少对峰高均值的影响。采用 24、26 或 28 个 PCR 循环，对 2.5 ng 或 10 ng 对照 DNA 9948 进行扩增。对样本进行一式三份的处理，并计算出平均峰高。

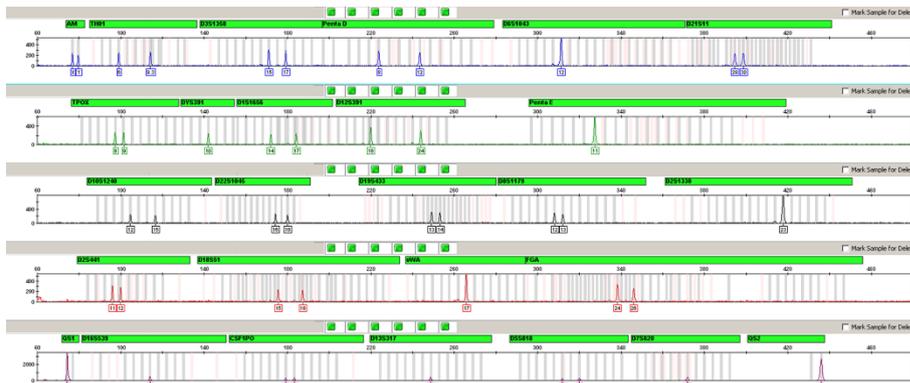


图 6. PCR 循环数目减少伴模板 DNA 量升高。图中显示的是采用 24 个 PCR 循环而不是标准的 30 个循环对 2.5 ng 对照 DNA 9948 进行扩增的结果。内质控的模板数量针对 24 或以上的循环数目经过优化，因此，循环数的减少未影响检测到的内质控信号。

不同的循环仪类型的影响

开发人员对 Investigator 26plex QS Kit 采用数个 PCR 热循环仪进行了测试，以显示该试剂盒具有不依赖于仪器的稳健性（图 7）。采用的 PCR 模板是 2 ng 至 32 pg 的对照 DNA 9948。反应在标准条件（30 个循环）下进行，并采用以下热循环仪：

- 带银块的 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)
- 带 96 孔镀金银块的 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)
- Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)
- Eppendorf Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Bio-Rad C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany)

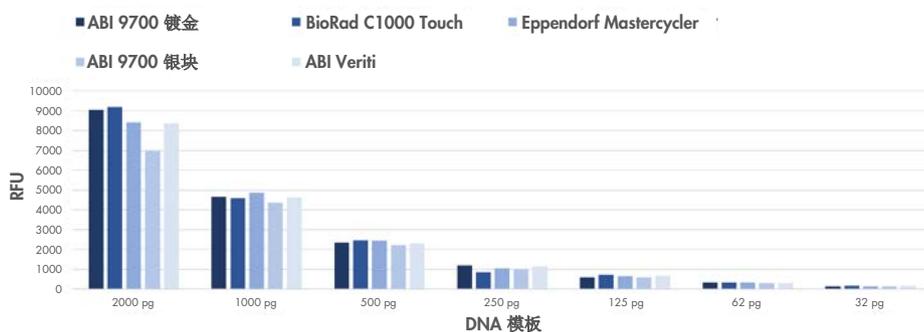


图 7. 不同 PCR 热循环仪上的性能。 如图所示，实验中采用了不同量的对照 DNA 9948。每个样本均作一式两份处理。操作方案采用标准的 30 个循环方案。图中显示出所有标记的平均峰高。

参与测试的所有 PCR 循环仪都获得了可比的峰高均值。没有任何热循环仪在基因座内和基因座间平衡或非特异性扩增方面显示出明显差异。

敏感性

Investigator 26plex QS Kit 经过专门设计，可针对广泛品质的 DNA 进行稳健的操作。对于比如使用 QIAGEN Investigator Quantiplex® Pro Kit 的人类 DNA real-time PCR 定量检测而言，推荐的用于生成优质 STR 图谱的输入 DNA 量为 500 pg。作为特例，对于发生严重降解的 DNA，增加模板的量可能会改善结果（见第 7 页）。

对于每个反应体系，对对照 DNA 9948 进行从 1 ng 至 8 pg 的系列稀释。采用《Investigator 26plex QS Kit 手册》中所述的标准条件，在 125 pg 浓度下，可毫无例外地获得完整的（42 个 PCR 产物的）图谱。当采用的模板 DNA ≤ 63 pg 时，由于存在随机效应，偶尔可观察到等位基因丢失的情况。与预期一致，丢失的发生数目随 DNA 浓度的降低而增多。低拷贝数样本中的预期等位基因检出数目见“不同循环数的影响”和图 4。

DNA 量过高导致的问题

尽管模板 DNA 量 > 1 ng 在 PCR 扩增中不会导致问题，但这样的样本仍可能会产生不准确或不可靠的数据。根据毛细管电泳所用的仪器和设置的不同，荧光信号的强度可能会超出范围。

“超范围”的峰经常与“拔高”峰伴随存在。另外，随着主峰信号变为饱和状态，可能会观察到影子峰与主峰的峰高比的增高。最后，由于 +A 核苷酸添加不完全，模板量非常大时可能会出现“分裂峰”。

高 DNA 浓度导致的 STR 图谱不良可通过使用含有更少模板 DNA 的样本来改进。

DNA 量过低导致的问题

对少于 ~100 pg 的 DNA 进行扩增可能会导致图谱不完整，缺少一个或更多的等位基因。此外，受随机波动的影响，PCR 反应中采用较低的等位基因拷贝数可能会导致扩增不平衡。

消除这类影响的方法包括：对相同的样本进行多次扩增，以获得一致的图谱；或向 PCR 反应中以最大体积添加该 DNA 模板，以便从单个反应中获得尽可能好的结果。为了能够正确解读 DNA 含量较低的样本，非常重要的一点是将背景荧光——比如由染料伪影造成的荧光——降至最低。图 8 和图 9 显示的是无模板扩增的示例。扩增产物的峰高以及背景噪音的水平取决于各实验室采用的仪器和设置。因此，我们建议对实验室内部验证获得的结果进行评估，以确定出适宜的等位基因检测阈值。

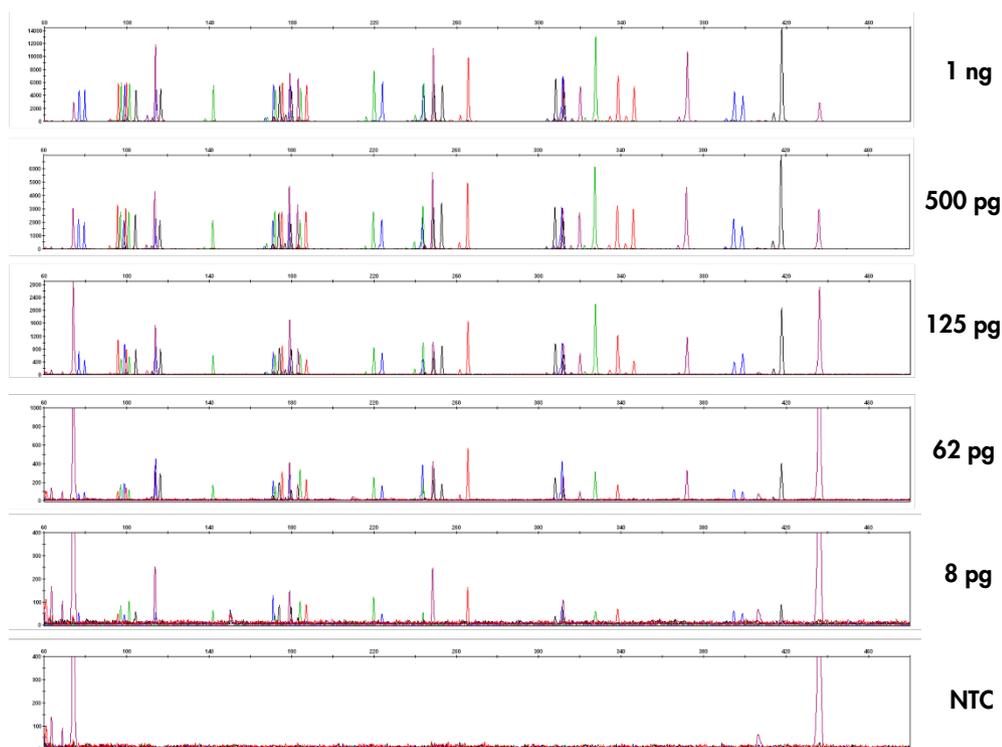


图 8. 敏感性研究。对经过系列稀释的对照 DNA 9948 进行了分析。以上图所示量的 DNA 作为模板进行扩增。最下面一栏为无模板（阴性）对照（No Template Control, NTC）的图谱，可显示出预期的背景荧光信号水平。每个图谱的 Y 轴尺度均经过调整，以适应 STR 标记的最高峰高。注意：鉴于内质控（第一个和最后一个紫色峰）在所有实验中均以类似的扩增效率进行扩增——与样本模板量无关，这些内质控的峰高在所有实验中都是相似的。

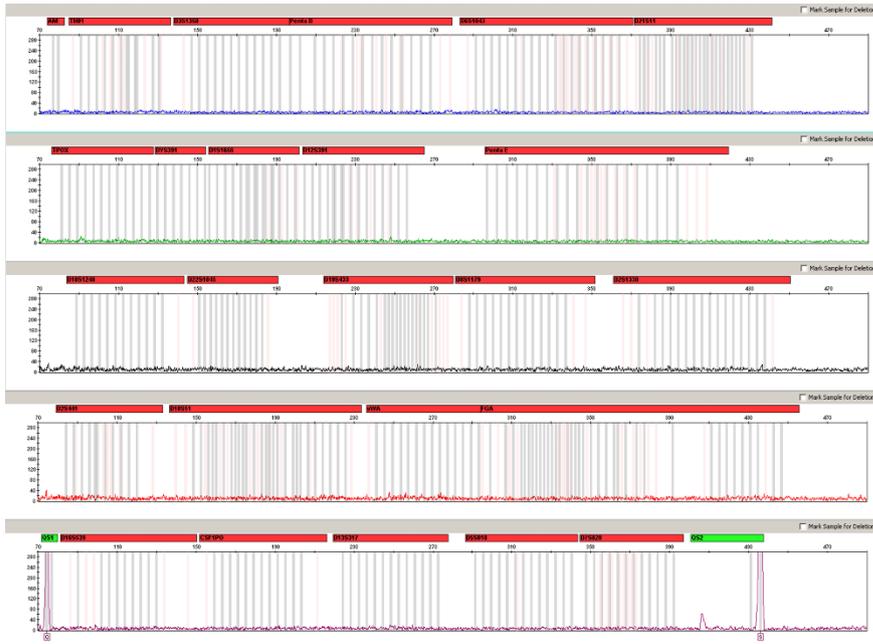


图 9. 背景荧光。 无模板（阴性）对照示例，可显示出预期的背景荧光信号水平。为了能够正确解读 DNA 含量较低的样本，非常重要的一点是将背景荧光降至最低。

模拟抑制条件下的性能

尽管 Investigator 26plex QS Kit 的反应试剂经过优化，对抑制物有更高的耐受性，但如果从法医案件样本中提取 DNA 的方法不当，Investigator 26plex QS Kit 的性能仍可能会受到影响。我们建议采用 QIAGEN 样本制备技术进行提取，因为这样可获得不含抑制物的纯 DNA。

为了测试该试剂盒在存在抑制物时的稳健性，开发人员在存在以下抑制物的条件下——从而模仿高难度的法医类样本——进行了检测：

- 腐植酸：一种对 PCR 有抑制作用的腐殖质主成分。对于从土壤上采集的法医样本，该成分可随 DNA 一起被提取。
- 血色素：由血红素经氧化形成，是血液的主要成分。它是从血斑中提取的 DNA 样本中的已知 PCR 抑制因子。
- 鞣酸：典型存在于皮革中的物质。在对案件证据检材进行提取时，鞣酸可能会与 DNA 一起被提取。
- 靛蓝胭脂红：蓝牛仔布（比如，牛仔布料）上的染料。
- 胶原：多种组织中的主要蛋白复合物。
- 钙质：骨分解过程中释放的物质。
- 乙醇：来自 DNA 提取过程的潜在携带污染。

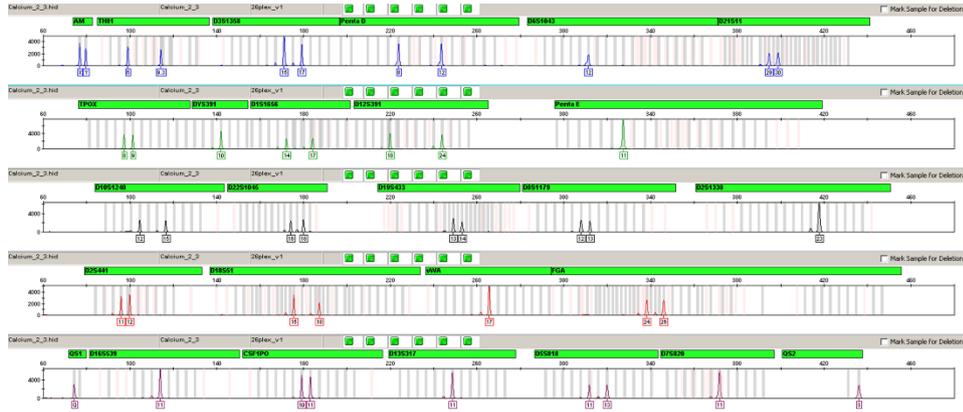


图 13. 在存在 2.5 mM 钙质的条件下对 500 pg 对照 DNA 9948 进行扩增的电泳图。

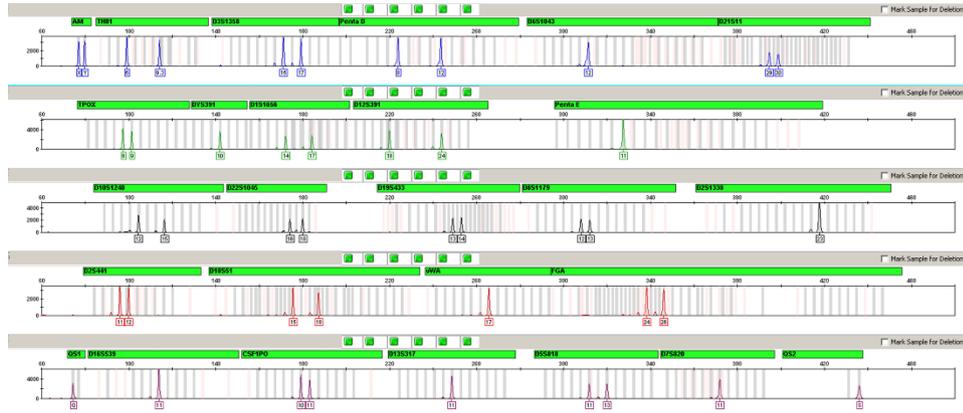


图 14. 在存在 2000 ng/μl 核酸的条件下对 500 pg 对照 DNA 9948 进行扩增的电泳图。

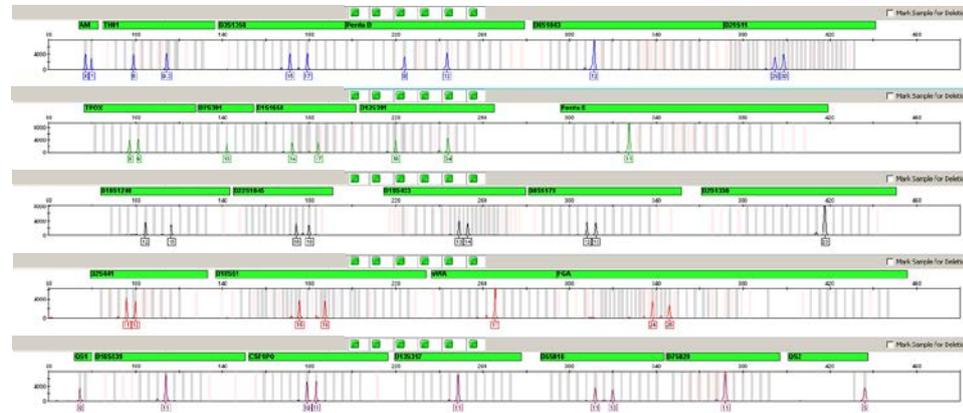


图 15. 在存在 0.5% 乙醇的条件下对 500 pg 对照 DNA 9948 进行扩增的电泳图。

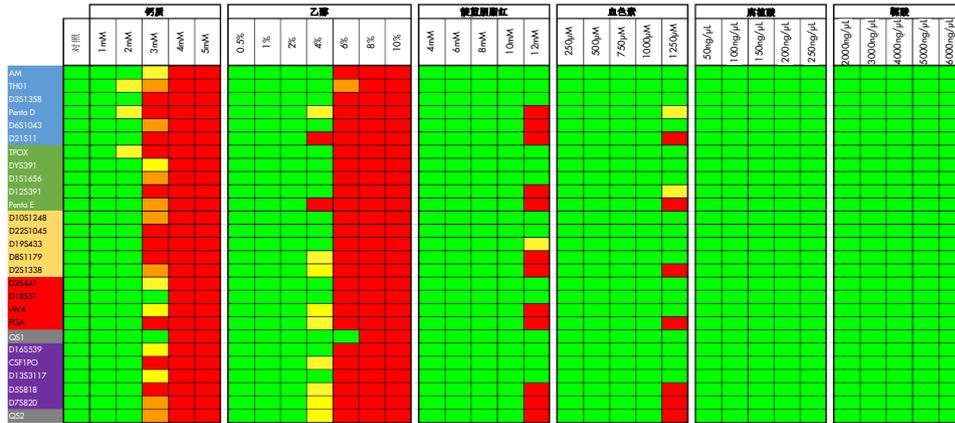


图 16. Investigator 26plex QS 抑制物耐受性概览。 开发人员对该检测就抑制物（钙、乙醇、靛蓝胭脂红、血色素、腐植酸和鞣酸）而言的稳健性进行了测试。实验中采用了 500 pg 的对照 DNA 9948 作为模板，且在标准条件下进行了 PCR 扩增。对于等位基因分型，采用了 50 RFU 作为阈值。绿色：一致的完整图谱。黄色：检出 75% 的预期 PCR 产物。橙色：检出 50% 的预期 PCR 产物。红色：检出不到 50% 的预期 PCR 产物。

实验结果表明，该检测可在广泛的抑制物浓度范围内获得不含任何 PCR 伪峰——比如分裂峰——的完整图谱。对于大多数抑制物（例如：腐植酸和血色素），峰高的降低程度与 PCR 产物的大小相关，且丢失首先见于扩增子最大的标记。通常而言，内质控 QS2 对抑制物更敏感，且在 STR 标记受累之前可观察到 QS2 的丢失（比如，靛蓝胭脂红和血红素的比较分析）。

请注意：该研究中采用的最高抑制物浓度在案件样本中是非常罕见的——即便在样本提取过程中采取了不适当的方法。

采用降解的 DNA 时的稳定性

案件证据检材经常暴露于苛刻的环境条件下，比如，紫外光、湿度或微生物滋生。因此，这些样本中提取的人源 DNA 可能伴有不同程度的降解。

开发人员使用人为降解的男性基因组 DNA 进行了验证。他们按照制造商的说明，使用 Adaptive Focused Acoustics® (Covaris system, Covaris Inc., Woburn, MA, USA) 将 DNA 剪切至 500 bp、300 bp 或 150 bp 的平均片段长度。以 500 bp DNA 作为模板进行扩增（所有样本均一式两份进行处理）（图 17）。采用平均片段长度为 500 bp 和 300 bp 的样本可获得完整的图谱。与预期一致，扩增子较大的基因座受到了 DNA 降解过程的影响。平均片段长度为 150 bp 时，采用 50 RFU 的阈值可检测出 ~70% 的预期峰（图 17）。对于严重降解的 DNA，可通过增大模板量来改善结果。

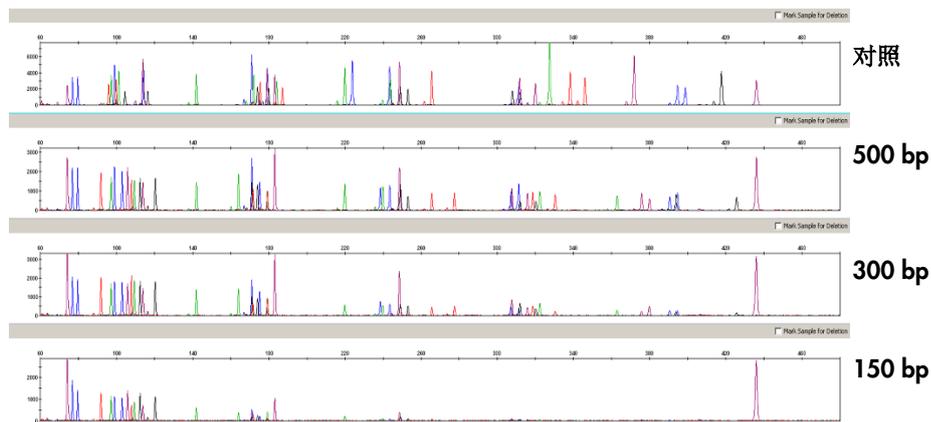


图 17. 降解的 DNA。 将男性 DNA 剪切至所示的特定平均片段长度。未经处理的对照 DNA 和降解的 DNA 样本的 STR 分析。模板 DNA 量为 500 pg。可获得完整图谱的样本的平均片段长度可低至 300 bp。注意：内质控不受 DNA 降解的影响，扩增获得的相应峰高是相当的。

物种特异性

法医案件样本中可能存在非人类 DNA。对于检测而言，不具有物种间交叉反应性至关重要。为了证实 Investigator 26plex QS Kit 对人类 DNA 具有物种特异性，开发人员使用标准检测操作方案对来自其他物种的 DNA 进行了测试（图 18）。

测试的物种除常见宠物和农场动物之外，还包括一些灵长类动物。与预期一致，对于灵长类动物，扩增出一些产物的可能性是存在的。来自黑猩猩、倭黑猩猩、红毛猩猩、大猩猩的样本可在所有通道产生位于标记信号范围内的峰，其中一些峰可与人类 STR 产物大小相匹配。

使用 Investigator 26plex QS Kit 检测的其他大部分动物 DNA 未显示出任何交叉反应性。

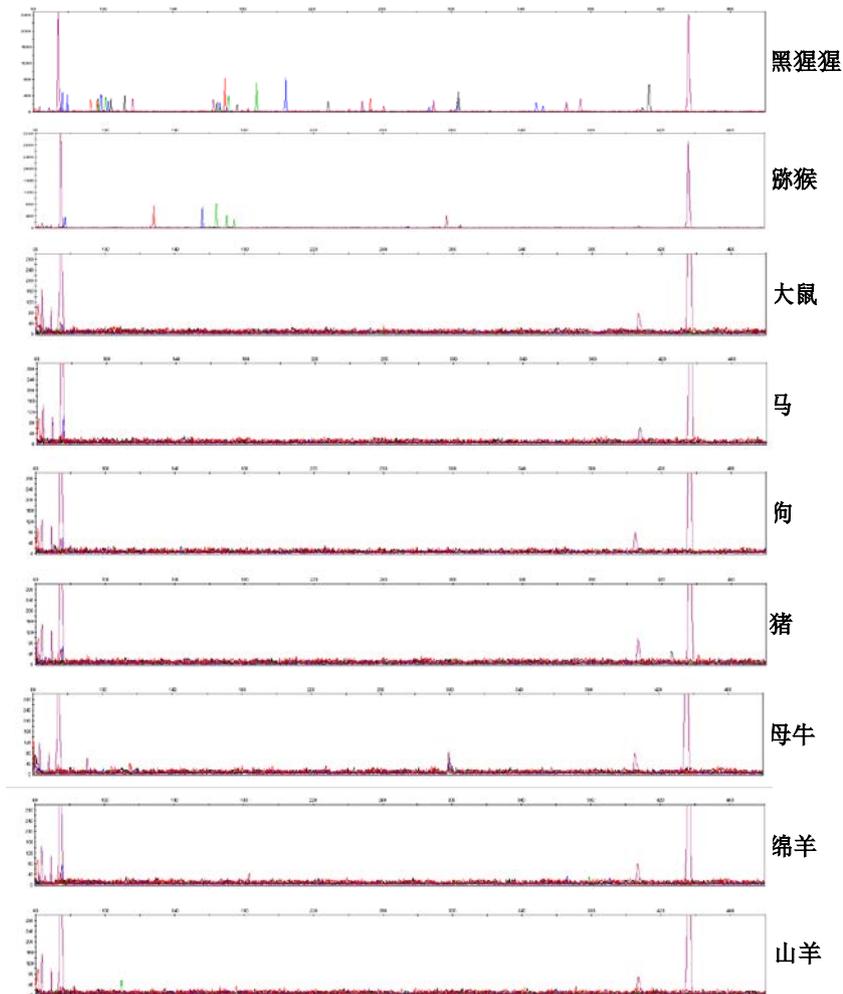


图 18. 物种特异性评估的代表性结果。对于灵长类动物，使用 500 pg DNA 作为模板；对于所有其他物种，使用 2.5 ng DNA 作为模板。

混合型样本研究

证据检材样本中的 DNA 往往不只来自一个个体。为了能够正确解读混合型样本的结果，了解仍可作出分检的次要贡献组分的检测限非常重要。

将 DNA BC2 与对照 DNA 9948 按照 1:1、3:1、7:1、10:1、15:1 的比例混合，以制备样本（混合型样本的基因型见表 3）。该研究中使用的该混合型 DNA 的总量为 500 pg；15:1 混合型样本含有 33 pg 的次要 DNA 组分和 467 pg 的主要 DNA 组分（表 2）。次要组分的检测限通过分析两种 DNA 组分间的非重叠等位基因来确定。在 3:1 和 7:1 混合型样本中，对于次要组分，均检测出了所有预期等位基因。10:1 和 15:1 样本通常在次要组分一方给出不完全的图谱。图 19 是 1:10 混合型样本的结果示例。由于这些样本含有的次要组分 ≤ 50 pg，所得的结果与本文中报告的单源样本的敏感性是一致的。为了增高针对次要组分的敏感性，如果可用的 DNA 量不受限制，则可采用更高的总 DNA 量。一般考虑事项，请见第 7 页的“敏感性”。

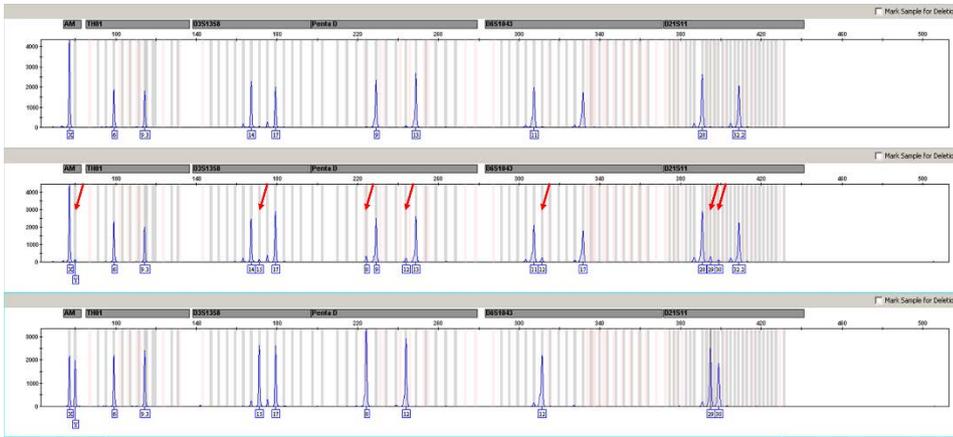
表 2.混合型样本中的模板 DNA 量

混合比例	主要组分 DNA BC2	次要组分 DNA 9948
1:1	250 pg	250 pg
3:1	375 pg	125 pg
7:1	430 pg	70 pg
10:1	450 pg	50 pg
15:1	467 pg	33 pg

表 3.组成混合型样本的 DNA 的基因型

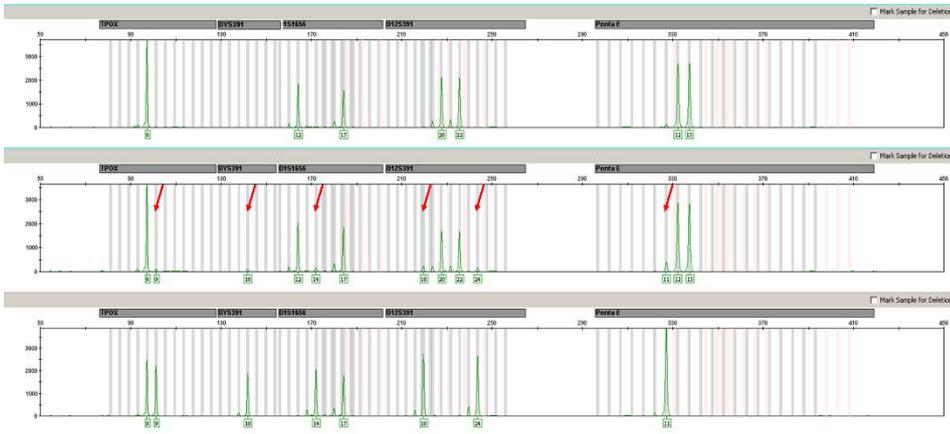
基因座	9948 基因型	BC2 基因型
Amelogenin	X/Y	X/X
CSF1PO	10/11	10/12
DYS391	10/10	-
D1S1656	14/17	12/17
D2S1338	23/23	17/24
D2S441	11/12	14/14
D3S1358	15/17	14/17
D5S818	11/13	11/11
D6S1043	12/12	11/17
D7S820	11/11	8/12
D8S1179	12/13	13/13
D10S1248	12/15	12/14
D12S391	18/24	20/22
D13S317	11/11	8/13
D16S539	11/11	9/11
D18S51	15/18	13/18
D19S433	13/14	13/14
D21S11	29/30	28/32.2
D22S1045	16/18	15/16
FGA	24/26	19/21
Penta D	8/12	9/13
Penta E	11/11	12/13
TH01	6/9.3	6/9.3
TPOX	8/9	8/8
vWA	17/17	16/19

A



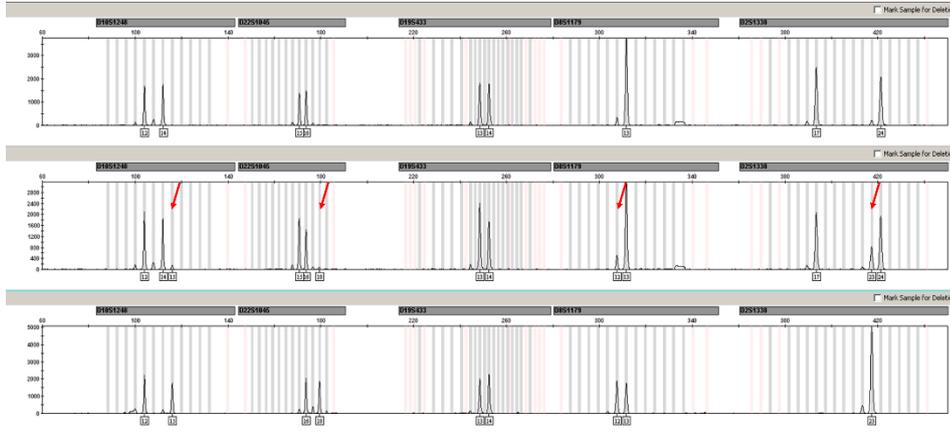
A. 红色箭头指示未被覆盖的次要组分峰的预期碱基对位置。**Amelogenin:** 纯合子 + 杂合子, 两个重叠的等位基因, 可分检出非重叠的次要组分峰。**TH01:** 杂合子 + 杂合子, 两个重叠的等位基因, 不可分检出非重叠的次要组分峰。**D3S1358:** 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分。**Penta D:** 杂合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 两个次要组分峰与影子峰位置重叠。**D6S1043:** 杂合子 + 纯合子, 可分检出次要组分峰。**D21S11:** 杂合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出次要组分。

B



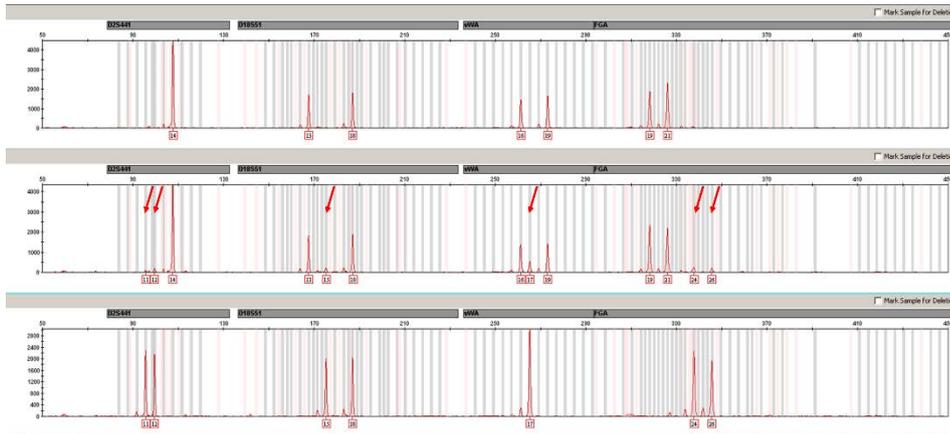
B. 红色箭头指示未被覆盖的次要组分峰的预期碱基对位置。**TPOX:** 纯合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分。**DYS391:** 无效等位基因 + 纯合子, 可分检出非重叠的次要组分峰。**D1S1656:** 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分峰。**D12S391:** 杂合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出两个次要组分峰。**Penta E:** 杂合子 + 纯合子, 没有重叠的等位基因, 一个次要组分峰与影子峰位置重叠。

C



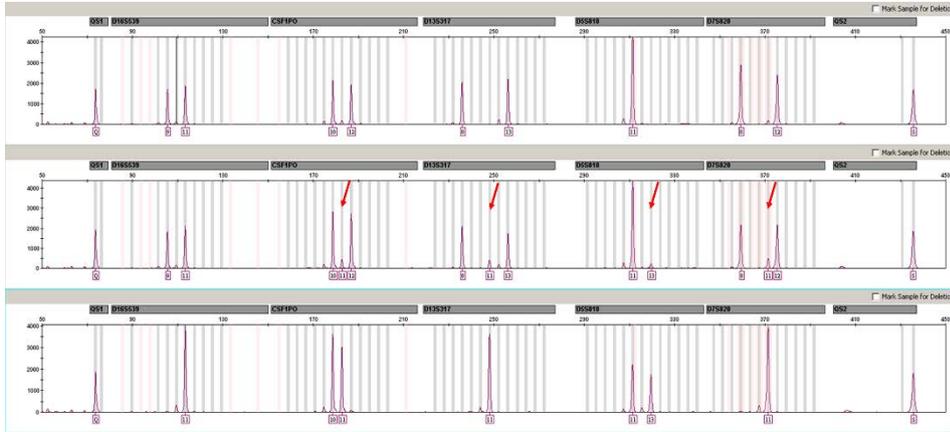
C. 红色箭头指示未被覆盖的次要组分峰的预期碱基对位置。**D10S1248**: 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个非重叠的次要组分峰。**D22S1045**: 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个非重叠的次要组分峰。**D19S433**: 杂合子 + 杂合子, 两个重叠的等位基因, 次要组分等位基因被主要组分等位基因覆盖。**D8S1179**: 纯合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 一个次要 (组分) 等位基因与影子峰位置重叠, 另一个次要组分被主要组分完全覆盖。**D251338**: 杂合子 + 纯合子, 一个次要 (组分) 等位基因与影子峰位置重叠。

D



D. 红色箭头指示未被覆盖的次要组分峰的预期碱基对位置。**D2S441**: 纯合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出两个非重叠的次要组分峰。**D18S51**: 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分峰。**vWA**: 杂合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分峰。**FGA**: 杂合子 + 杂合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出所有次要组分峰。

E



E. 红色箭头指示未被覆盖的次要组分峰的预期碱基对位置。**D16S539**: 杂合子 + 纯合子, 一个重叠的等位基因, 另一次要组分被主要组分覆盖。**CSF1PO**: 杂合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个与影子峰位置重叠的次要组分峰。**D13S317**: 杂合子 + 纯合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分峰。**D5S818**: 纯合子 + 杂合子, 一个重叠的等位基因, 可分检出一个次要组分峰。**D7S820**: 杂合子 + 纯合子, 没有重叠的等位基因, 可分检出与影子峰位置重叠的次要组分峰。QS1 和 QS2 是 PCR 内部质控对照, 在所有实验中, 扩增后所得的峰高均相当。

图 19. 混合型样本分析结果。 图 19A - 19E 显示的是 DNA BC 2 和对照 DNA 9948 的 1:10 混合样本 (每个图中的中栏) 及作为参照的相应单源性样本 (每个图中的上、下栏) 的结果。红色箭头指示不与主峰重叠的次要组分 DNA 峰的预期位置。每个图的下方给出了针对单个标记的混合型样本情况简述。

可重复性: 一致性测试

Investigator 26plex QS Kit 中的大多数引物序列均具有很高的保守性, 并采纳自其他 QIAGEN 试剂盒——包括 Investigator 24plex QS、Investigator ESSplex SE QS 或 Investigator IDplex Plus Kits。这些引物在国家标准与技术研究院 (National Institute of Standards and Technology, NIST) 的相应一致性研究中显示出高水平的一致性, 且迄今为止, 在不同实验室现场中显示出可靠的结果。D6S1043、D21S11、Penta D、Penta E 和 FGA 的引物是采用高级的生物信息学软件设计出的新引物, 可确保高特异性和敏感性, 并具有与现有引物的退火温度 (T_m) 范围相匹配的最佳 T_m 。为了展示 Investigator 26plex QS Kit 中的新设计引物的一致性, 开发人员对 94 份样本开展了一项内部研究。对于标记 D6S1043、Penta D、Penta E、D21S11 和 FGA, 使用 Investigator 26plex QS Kit 得到的结果与使用 VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit 和 PowerPlex® 21 System 等试剂盒得出的结果是一致的。其余标记物的引物与 Investigator 24plex QS Kit 的引物完全相同。Investigator 24plex QS Kit 的一致性已经得到证实——NIST 将采用 Investigator 24plex QS Kit 对 656 名无关联个体 [NIST 美国人群集 (650 个样本) 和 SRM 2391c (6 个样本)] 进行检测得到的结果与 NIST 的最终数据集进行了比较。完整的一致性评估通过与 NIST SRM 2391c 认证值的比较得出。在全体数据集中, 未观察到无效等位基因。对于 D7S820 (656 份样本中的 1 份样本), 发现了一个不一致的结果。对于 D7S820, 采用 Investigator 24plex QS Kit 得出的结果与采用比如 Identifiler®、PowerPlex Fusion 和 Profiler Plus® 等试剂盒得出的结果是一致的, 但与采用比如 PowerPlex 16、AmpFℓSTR® MiniFiler™ 和 IDplex Plus 等试剂盒得出的结果之间存在不一致。在所有进行比较的 29,520 个等位基因中, 观察到 1 个不一致的分型, 不一致率为 0.003%。总之, Investigator 24plex QS Kit 与 NIST 最终数据集之间的一致率达 99.997%。

对于 Investigator 26plex QS Kit，开发人员对 50 份样本的杂合体标记的峰高比进行了分析（图 20），并对 94 份样本的影子峰峰高（图 21）进行了分析。

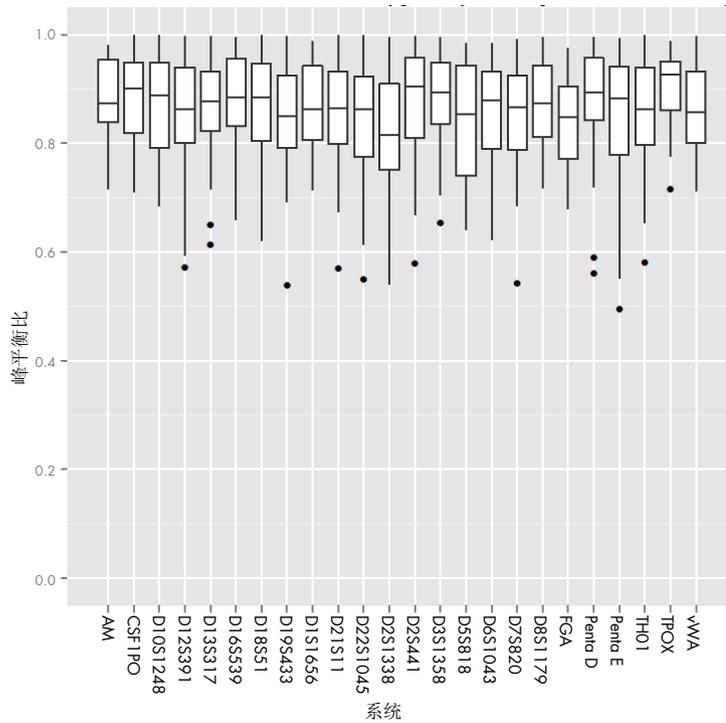
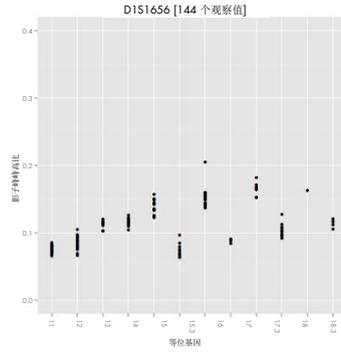
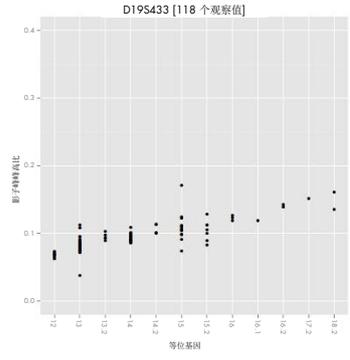
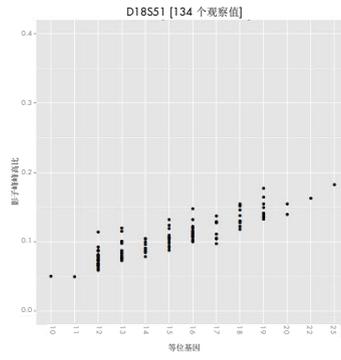
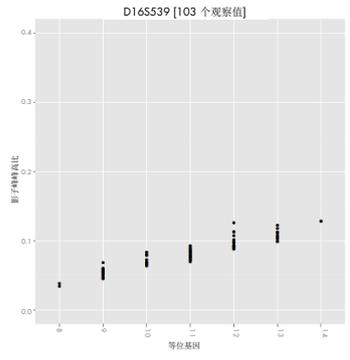
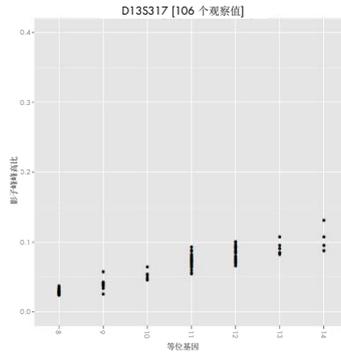
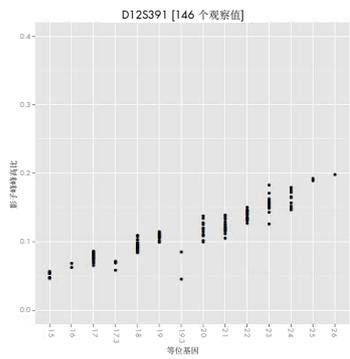
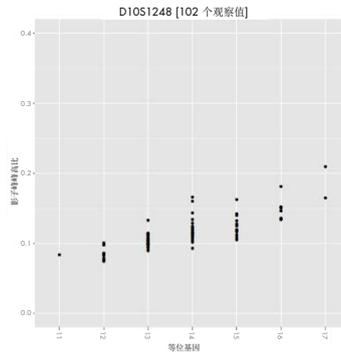
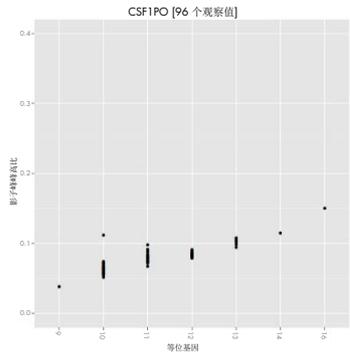
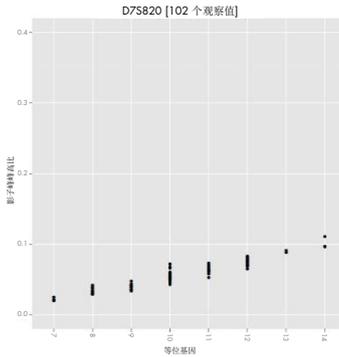
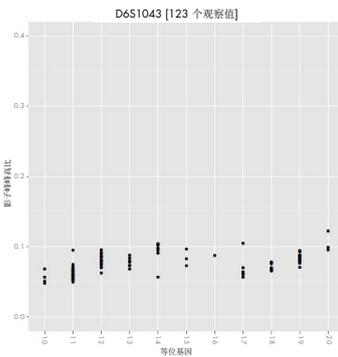
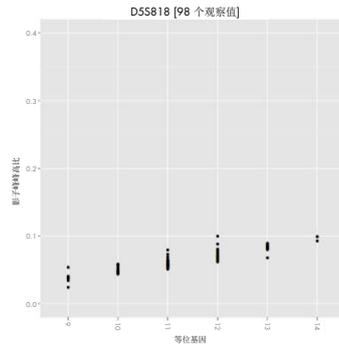
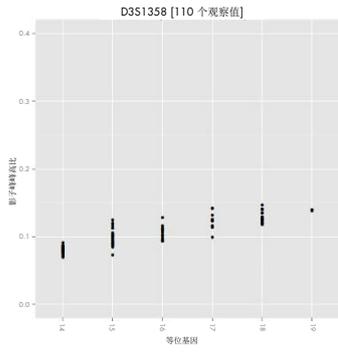
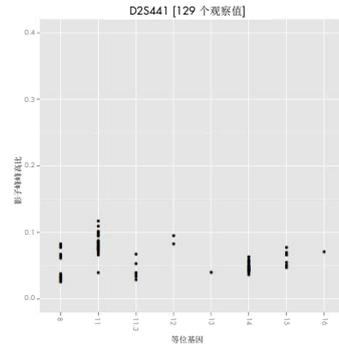
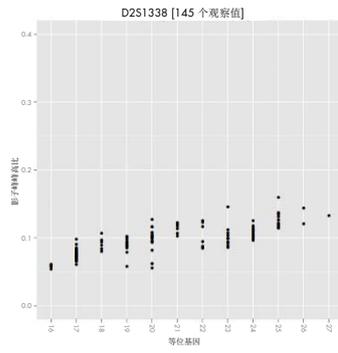
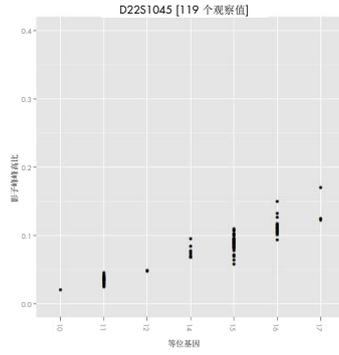
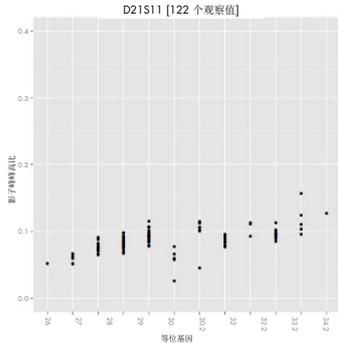


图 20. 基因座内峰高比箱线图分析。 值为杂合体样本的 2 个峰中的较低者。箱体代表数据的中 50% 范围 [四分位间距 (interquartile range, IQR)]; 箱体中线代表中位值。须线代表位于 1.5 IQR 以内的数据，点代表离群值。





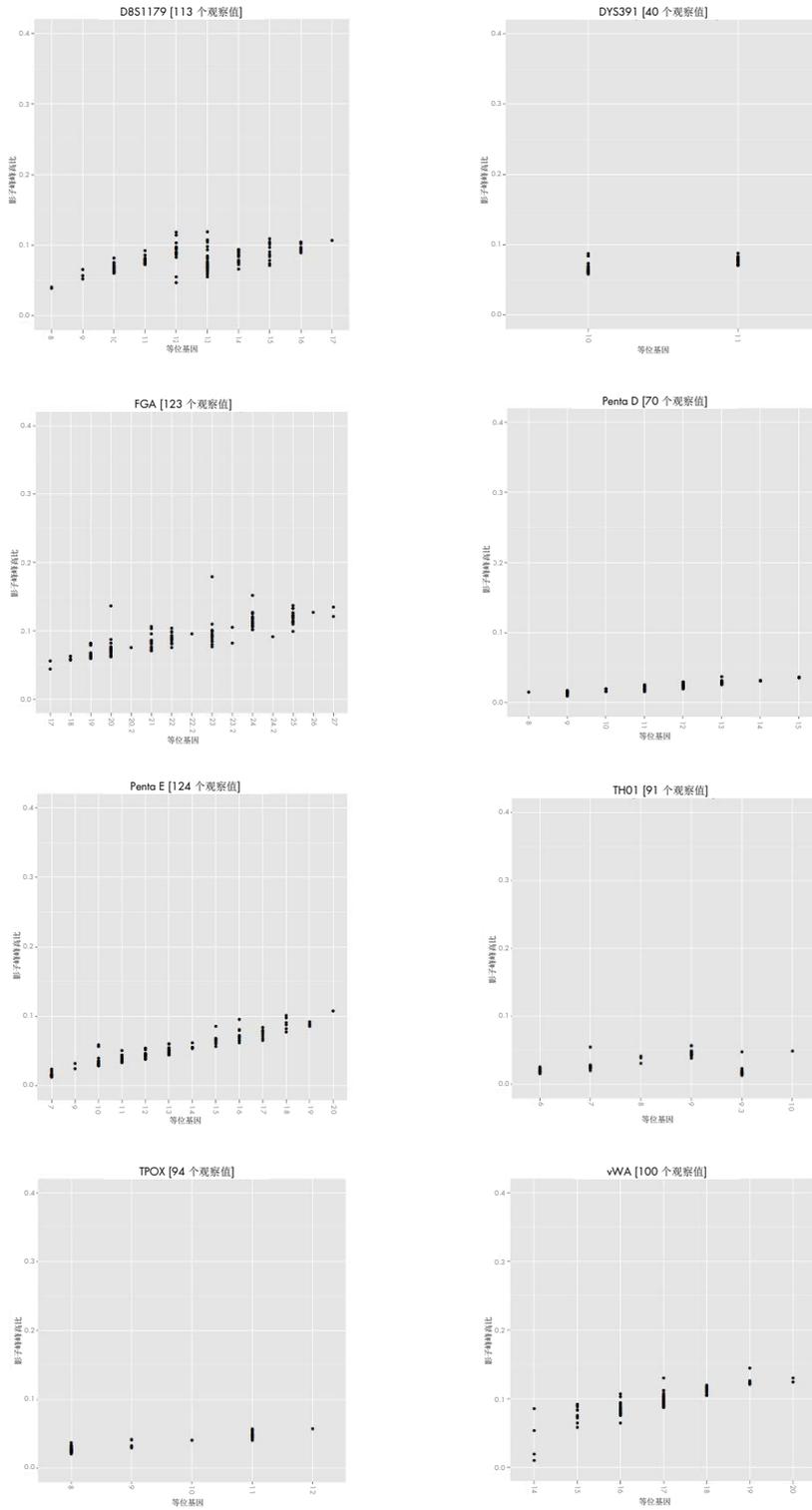


图 21. 影子峰峰高比。开发人员对 94 份来自不同供体的 DNA 样本进行了前影子峰与主峰间的峰高比较分析。

稳定性——改良的热启动功能

一般而言，PCR 的运行过程直接了当，在 PCR 移液步骤和热循环仪运行启动之间没有停顿。当采用某设备进行自动化 PCR 设置时，则可能需要数小时才能完成一个或更多的反应孔板的移液。为了防止室温下的错误引发导致的不良影响，Investigator 26plex QS Kit 中纳入了改良的热启动功能。该试剂盒可使多重 PCR 反应具有更高的特异性和效率（图 22）。反应体系可在室温下保持稳定达 3 小时，而无需任何冷却，这一便利性使该试剂盒非常适于处理高通量样本或采用自动化 workflow。

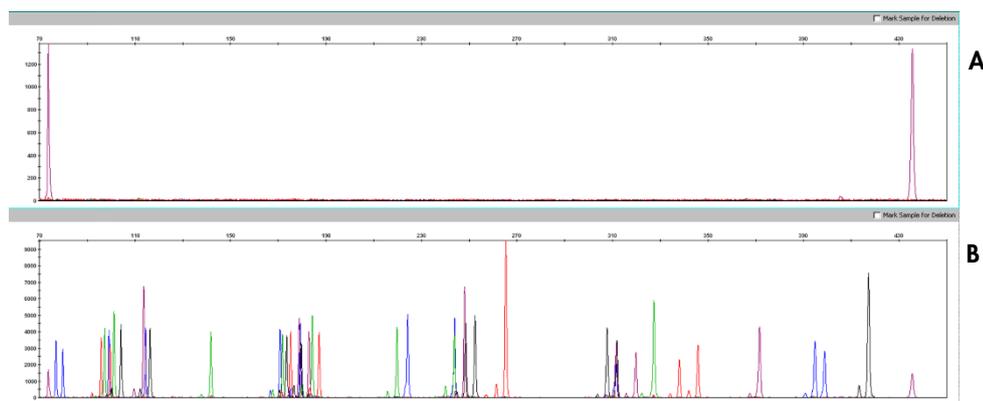


图 22. 3 小时室温孵育下的反应体系稳定性。在 PCR 移液步骤和热循环仪启动之间，开发人员将 PCR 样本在 20° C 下孵育了 3 小时。**A:** 阴性对照。**B:** 以 500 pg DNA 9948 作为 PCR 模板时的结果。

如上所示，在进行 PCR 循环之前，将 PCR 预混液置于室温下存放 3 小时后，试剂盒的总体性能并未受到影响；没有出现任何非特异性 PCR 扩增产物。

参考文献

- ENFSI Standing Committee for Quality and Competence (QCC). (2006) Validation and Implementation of (New) Methods. Ref. Code: QCC-VAL-001, Issue No. 001, November 2006. http://www.enfsi.eu/get_doc.php?uid=144.
- Forensic Science Communications. (2004) Revised Validation Guidelines of Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), **6 (3)**, July 2004. www.cstl.nist.gov/strbase/validation/SWGDAM_Validation.doc.
- Gill, P., et al. (2006) The evolution of DNA databases-Recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* **156**, 242.
- Phillips, C., et al. (2011) Analysis of global variability in 15 established and 5 new European Standard Set (ESS) STRs using the CEPH human genome diversity panel. *Forensic Sci. Int. Genet.* **5**, 155.
- Butler, J.M., Shen, Y., and McCord, B.R., (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* **48**, 1054.
- Lareu, M.V., et al. (1996) A highly variable STR at the D12S391 locus. *J. Legal Med.* **109**, 134.

订购信息

产品名称	内容物	目录编号
Investigator 26plex QS Kit (100)	引物混合液、Fast Reaction Mix 3.0、对照 DNA、等位基因分型标准物、26plex QS 和无 RNA 酶水	382615
Investigator 26plex QS Kit (400)	引物混合液、Fast Reaction Mix 3.0、对照 DNA、等位基因分型标准物、26plex QS 和无 RNA 酶水	382617

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 试剂盒手册或用户手册。QIAGEN 试剂盒手册和用户手册可从 www.qiagen.com 或 QIAGEN 技术服务部或您的当地经销商处获得。

商标：QIAGEN®、Sample to Insight®、Investigator®、MinElute®、Quantiplex® (QIAGEN Group)、Veriti® (Applied Biosystems, LLC)、Adaptive Focused Acoustics® (Covaris, Inc.) Eppendorf®、Mastercycler® (Eppendorf AG)、3500™、AmpF1STR®、Applied Biosystems®、GeneAmp®、Identifiler®、MiniFiler™、Profiler Plus® (Life Technologies Corporation)、PowerPlex® (Promega GmbH)。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。

02/2020 HB-2765-001 © 2020 QIAGEN，保留所有权利。

