

Microreader™ Y Prime Plus Direct ID System

使用说明书

1. 产品简介

Microreader™ Y Prime Plus Direct ID System 采用 6 色荧光标记，多重扩增检测 38 个 Y 染色体基因座。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。可以对滤纸或 FTA 卡为载体的血斑或唾液斑进行直接扩增，无需模板提取和纯化，同时适用于提取的 DNA 模板。所检测的位点中包含 DYS393、DYS570、DYS19、DYS392、DYS549、Y GATA H4、DYS460、DYS458、DYS481、DYS635、DYS448、DYS533、DYS456、DYS389I、DYS390、DYS389II、DYS438、DYS576、DYS391、DYS439、DYS437、DYS385a/b、DYS643、DYF387S1、DYS627、DYS449、DYS518、rs2032678、DYS447、DYS444、DYS557、DYF404S1、DYS527a/b 以及 DYS596。

有关 ISO18385 标识的解释，本产品经过 ISO18385 认证级的法医级产品。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，请 4℃保存并避免反复冻融；如长时间不使用，请将酶试剂盒内的 Master Mix 放入-20℃保存。
- 检测组份试剂盒请置于“电泳检测室”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，请使用以下参数。请参阅仪器用户手册了解更多详细信息。

表 1 Microreader™ Y Prime Plus Direct 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 型	HID36_POP4	J6/Anydye	3KV	10S*
ABI®3130xL 型	HIDFragmentAnalysis36_POP4	J6/Anydye	3KV	10S*

* 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信号值。

4. PCR 扩增体系

配制体系前务必将完全融化后的 Master Mix 和引物混合物漩涡震荡 10 秒钟，然后

短暂离心。

表 2 Microreader™ Y Prime Plus Direct ID System 扩增体系

反应组份	25μL 体系加入量
Microreader™ 2× Master Mix V	12.5μL
Microreader™ Y Prime Plus 5× Primer Mix	5μL
模板 DNA	1.2mm 直径* (血卡或者血滤纸) DNA 模板 (0.5ng-2ng)
加 ddH ₂ O 至反应终体积	25μL

* 请将滤纸片或 FTA 卡片完全浸入反应溶液体系，否则可能造成扩增失败；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。

* 对于新采集的血卡请将检材置于 95℃ 烘干 10min 效果更佳。

5. 扩增程序

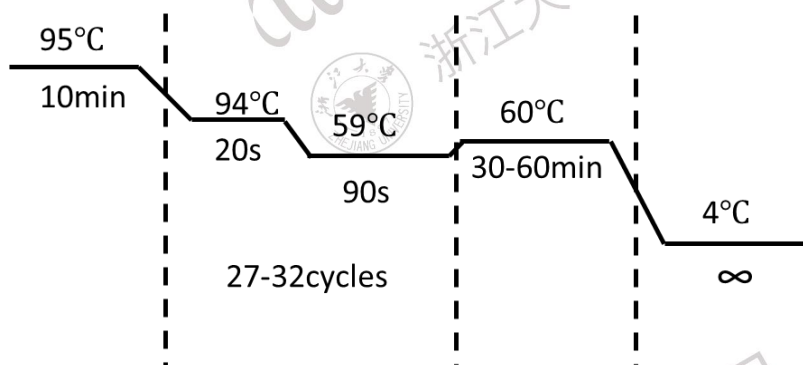


图 1 ABI 9700 热循环仪 PCR 反应程序设置

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℃ 或更高温度的环境中，可能会使产物降解。

（3）扩增循环数与终延伸时间根据具体样本而定，推荐使用 28 个循环，终延伸 60min。

6. 光谱校正（以 3500 型遗传分析仪为例）

（1）光谱校正前先更换水和阴阳极 Buffer，按 10μL 甲酰胺：0.5μL 6 Dye Matrix Standard 的比例配制甲酰胺和荧光标准物混合物，轻轻震荡混匀后短暂离

心。

(2) 准备一块新的 96 孔反应板，将配制好的混合物均匀的分装在前三列各孔中。95℃ 加热 3 min，立即冰浴 3 min，完成后装载 96 孔板并置于仪器托盘中。

(3) 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。

注意：去离子甲酰胺的质量对实验很重要。去离子甲酰胺应分装置于 -20℃ 冻存，反复冻融或长时间的置于 4℃ 保存会导致去离子甲酰胺的降解。质量不好的去离子甲酰胺可能含有离子，在电泳进样时与 DNA 发生竞争，这样会使电泳图谱信号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。去离子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 1μL

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

(3) Allelic Ladder (等位基因阶梯) 使用量：1μL；

(4) 电泳 Protocol 的建立：

4.1 创建 Instrument Protocol：进入 library 界面，选择 Instrument Protocols 菜单，点击 Create。注意将 Protocol Name 命名为“MR_J6_Y Prime Plus”，进样条件设置为电压 3kv，时间 6~10 sec，Dye Set 选择提前设置好的“MR_J6”。

4.2 创建 Sizecalling Procotol：进入 library 界面，选择 Sizecalling Procotol 菜单，点击 Create。在 Size Standard 下拉菜单中选择“QD550”，其他选择默认。点击 Save 保存。

4.3 创建 Assay：进入 library 界面，选择 Assays 菜单，点击 Create。在 Assay Name 中输入“Microread_Y Prime Plus”，Application Type 下拉菜单中选择“Fragment”，Instrument Protocol 下拉菜单中选择 4.1 中创建的“MR_J6_Y Prime Plus”，Sizecalling Procotol 下拉菜单中选择 4.2 中创建的“MR_Y Prime Plus_Sizecalling Procotol”。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、Sizecalling Procotol 并将其保存至 Library 中。

4.4 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“MR_Sample name”，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。

4.5 创建 Result Group：进入 library 界面，选择 Result Groups 菜单，点击 Create。在 Name 中输入“MR_Result group”，其他参数可根据个人喜好进行更改。注意在 Select File Location 应与 4.4 中选择 Custom File Location 位置相同。待所有设置完成后点击 Save 保存。

4.6 创建 Plate Template：a、进入 library 界面，选择 Assign Plate Contents 菜单，在 New Plate 下拉菜单中选择 Create Plate from Template，在该界面中选择软件自带的 ABI 样品表模板“6dye_36_POP4”双击打开。b、将 ABI 样品表模板“6dye_36_POP4”中 Assays、File Name Conventions 和 Results Groups 栏目下的各可选项逐一删去。c、在 Assays、File Name Conventions 和 Results Groups 各栏目下点击 Add from library，分别向各栏目中加入 Microread_Y Prime Plus、MR_Sample name 和 MR_Result group。d、各栏目选项加入完成后点击 Save Plate 菜单，选择 Save as 后输入“MR_Plate template”，点击 ok 保存即可。

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&Bins，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™ Y Prime Plus 5× Primer Mix	500μL*2 支
	Control DNA M308(2ng/μL)	25μL*1 支
	Nuclease-Free Water	1800μL*2 支
Taq 酶试剂盒	Microreader™ 2× Master Mix V	1250μL*2 支
检测组分试剂盒	Microreader™ Y Prime Plus Allelic Ladder	40μL*1 支
	Microreader™ Size Standard QD550	150μL*2 支
	6-Dye Matrix Standards	25μL*1 支

附表 2: Microreader™ Y Prime Plus Direct ID System 基因分型信息

基因座	荧光标记	M308 基因型	9948 基因型
rs2032678	FAM	2	2
DYS393	FAM	13	13
DYS570	FAM	17	18
DYS19	FAM	14	14
DYS392	FAM	13	13
DYS549	FAM	13	13
Y GATA H4	FAM	12	12
DYS444	FAM	13	12
DYS460	HEX	11	11
DYS458	HEX	17	18
DYS481	HEX	22	24
DYS635	HEX	24	23
DYS438	HEX	12	11
DYS447	HEX	25	25
DYS596	HEX	16	16
DYS456	TAMRA	15	17
DYS389I	TAMRA	13	13
DYS390	TAMRA	24	24
DYS389II	TAMRA	29	31
DYS448	TAMRA	19	19
DYS533	TAMRA	12	12
DYS449	TAMRA	30	30
DYS391	ROX	11	10
DYS439	ROX	13	12
DYS437	ROX	15	15
DYS385a/b	ROX	11/14	11/14
DYS643	ROX	10	11
DYS518	ROX	37	38
DYS576	PURP	19	16
DYF404S1	PURP	15/16	12/14
DYF387S1	PURP	34/36	35/38
DYS627	PURP	24	22
DYS527a/b	PURP	21/24	21/22
DYS557	PURP	16	16

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

