



DNA STR ANALYSIS

TROUBLESHOOTING GUIDE





DNA

STR

ANALYSIS

TROUBLESHOOTING
GUIDE

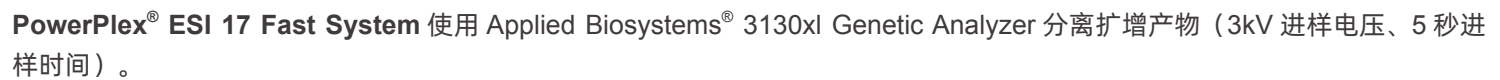
STR 分析疑难解答

分析流程中不当操作导致的后果

STR 分析流程 - 每一步都至关重要

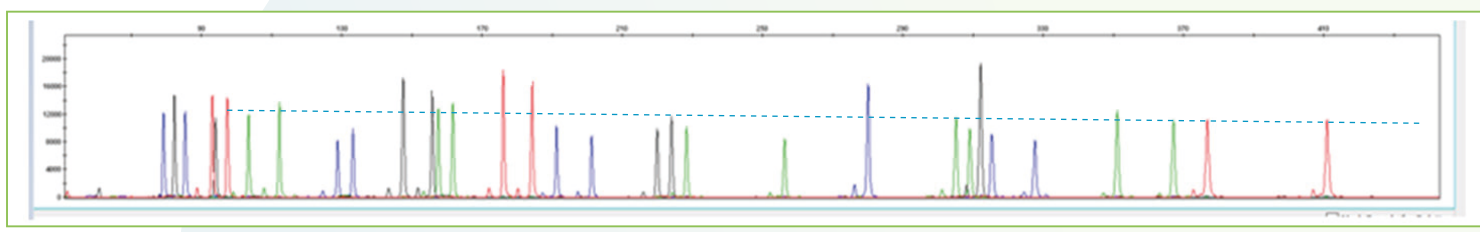
- DNA 提取 6
- DNA 定量 12
- DNA 扩增 22
- DNA 分离和检测..... 36

“理想状态下”



STR 图谱

“理想状态下”



PowerPlex® ESI 17 Fast System 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物（3kV 进样电压、5 秒进样时间）。

- 完整图谱
- 良好的基因座内均衡 *等位基因均衡*
- 良好的染料通道内均衡 *染料通道内均衡*
- 良好的染料通道间均衡 *染料通道间均衡*
- 良好的峰性状
- 峰值高度处于最佳水平

针对不同类型的测序仪建议的峰值高度水平		
仪器	建议信号水平	荧光饱和度
Spectrum Compact CE System	175–12,000 RFU	30,000 RFU
Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzers	175–10,000 RFU	30,000 RFU
Applied Biosystems® 3730 Genetic Analyzers	150–10,000 RFU	30,000 RFU
Applied Biosystems® 3130, 3130xl Genetic Analyzers	150–4000 RFU	8000 RFU
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzers	150–4000 RFU	8000 RFU

STR DNA EXTRACTION



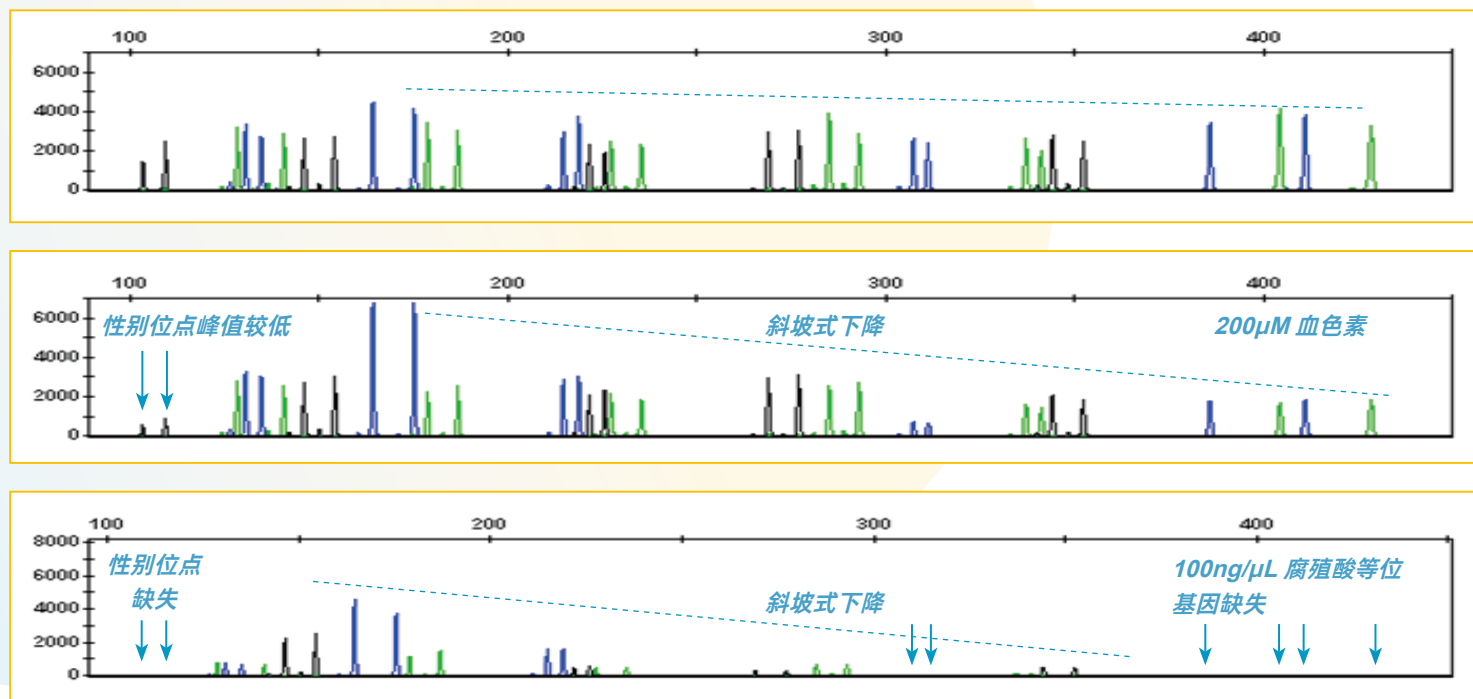
STR 分析疑难解答

DNA 提取

- 使用可高效去除 PCR 抑制剂和提供纯净 DNA 的提取方法
- 在 TE-4 缓冲液中洗脱 DNA (例如 *DNA IQ™ system* 中的洗脱缓冲液)
- 防止乙醇残留

STR 图谱中的斜坡式下降以及性别位点减少

PCR 抑制剂

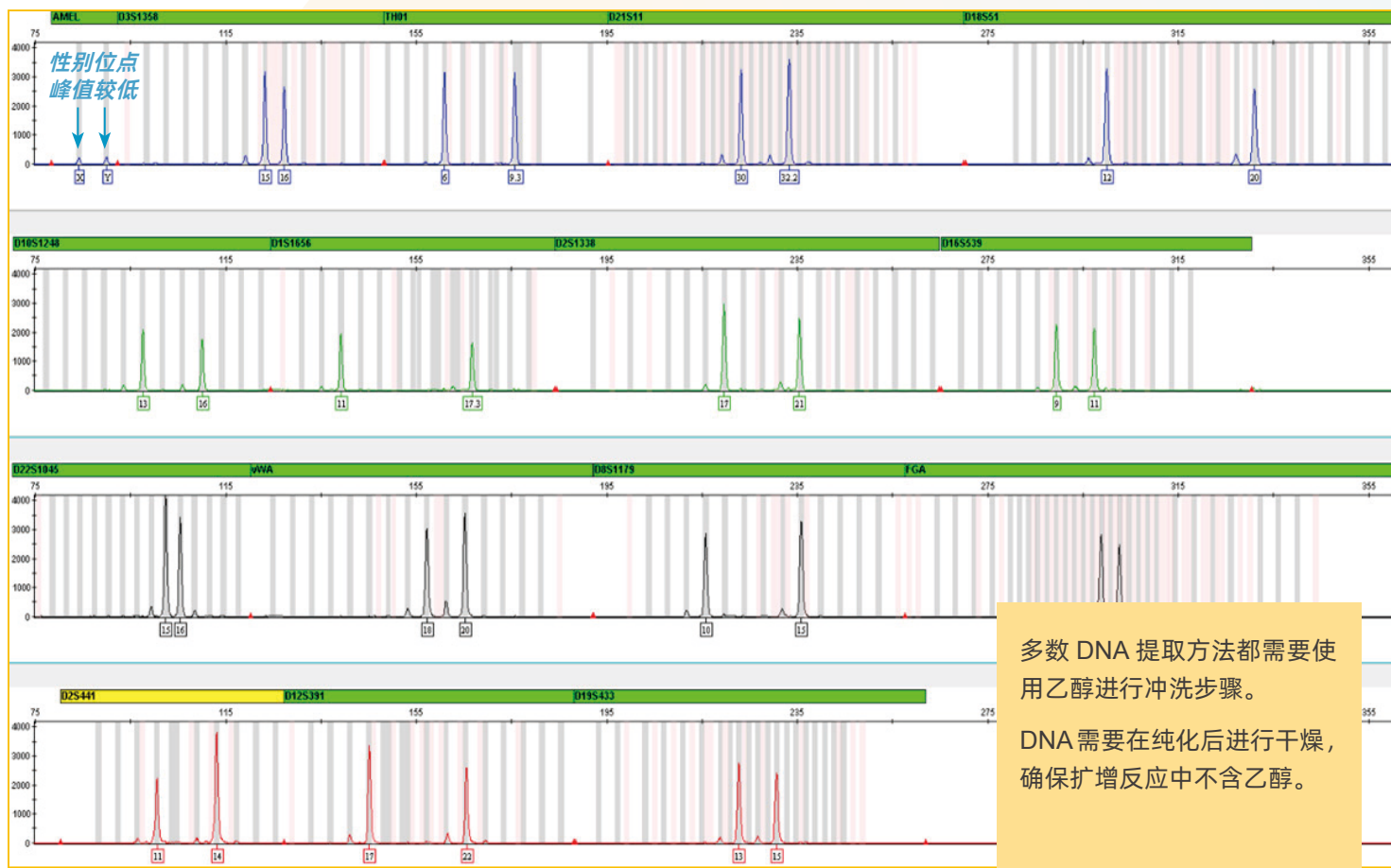


PowerPlex® 16 HS System 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

🔔 使用可去除 PCR 抑制剂的提取方法!

性别位点较低，其他 STR 图谱良好

乙醇残留

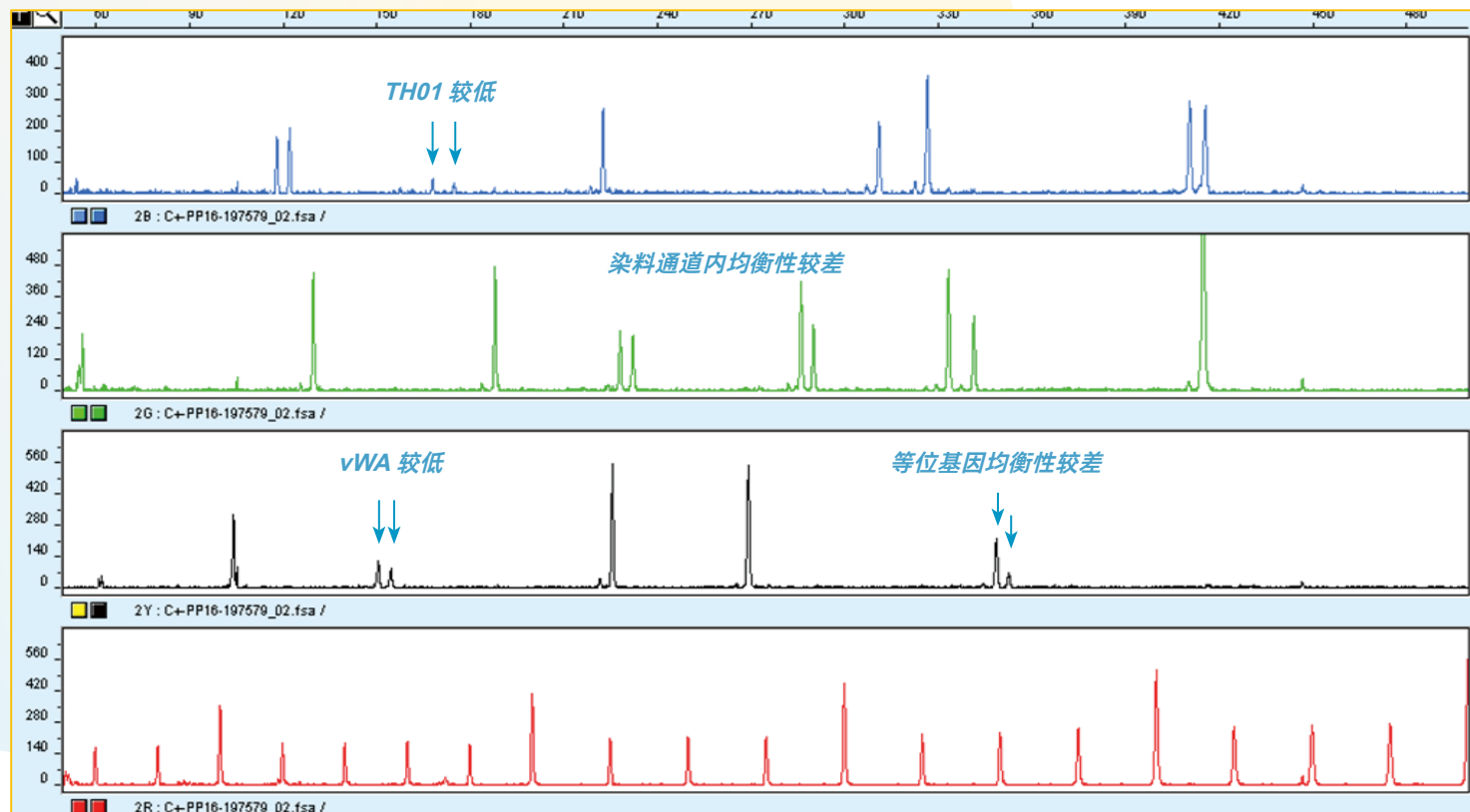


PowerPlex® ESX 17 Fast System 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

🔔 不可省去或缩短 DNA 提取流程中的清洗步骤！

不平衡的 STR 图谱

TE 缓冲液 (T₁₀E₁) 可用于 DNA 洗脱



PowerPlex® 16 System. 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

🔔 在 TE-4 缓冲液中洗脱 DNA !

TE (T₁₀E₁) 缓冲液概述

关键细节

TE (T₁₀E₁) 缓冲液含有高浓度的 EDTA。

结果：

- EDTA 与镁离子螯合或结合
可用的 Mg²⁺ 离子量减少
聚合酶需要 Mg²⁺ 离子才能发挥作用
- 聚合酶活性降低
某些位点比其他位点对于聚合酶活性的降低更加敏感

不均衡的 STR 图谱

TE 缓冲液 (T₁₀E₁) 可用于 DNA 洗脱

如果由于使用了 T₁₀E₁ 缓冲液导致图谱不均衡，可使用 TE-4 缓冲液代替。

TE⁻⁴ 缓冲液

- 10 mM Tris-HCl
- **0.1 mM** EDTA (pH 8,0)

T₁₀E₁ 缓冲液

- 10 mM Tris-HCl
- **1 mM** EDTA (pH 8,0)

STR DNA QUANTIFICATION



STR 分析疑难解答

DNA 定量 (qPCR)

- 不可盲目相信 HID Real-Time PCR Analysis Software 可以评估染料光谱。应亲自检查校准光谱
- 使用建议的反应板和封板膜
- 注意反应板应具备良好的密封性，避免蒸发
- 用 PowerQuant[®] System 的结果展示下一步骤

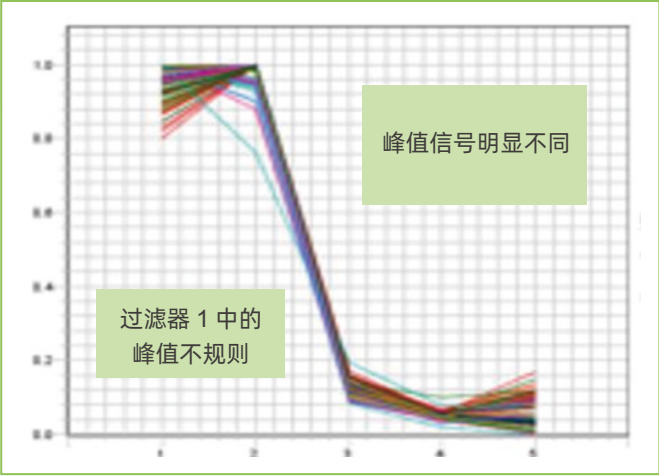
常染色体 DNA 未定量

染料校准较差

孔	样本名称	【自动】	【度】	【Y】	IPC Cq
C12	Sample 2	0,0000	2,6157	2,2108	21,00
D12	Sample 2	0,0000	2,1735	3,2051	21,22
均值	Sample 2	0,0000	2,3946	2,7080	21,06
A12	Sample 50	0,0000	50,1331	50,4322	35,55
B12	Sample 50	0,0000	62,3636	46,6547	32,73
均值	Sample 50	0,0000	56,2484	48,5435	34,14

↑
PowerQuant®
常染色体靶点 (FAM)
通道检测失败

CFG540 (Y- 靶) 的光谱较差,
不应接受

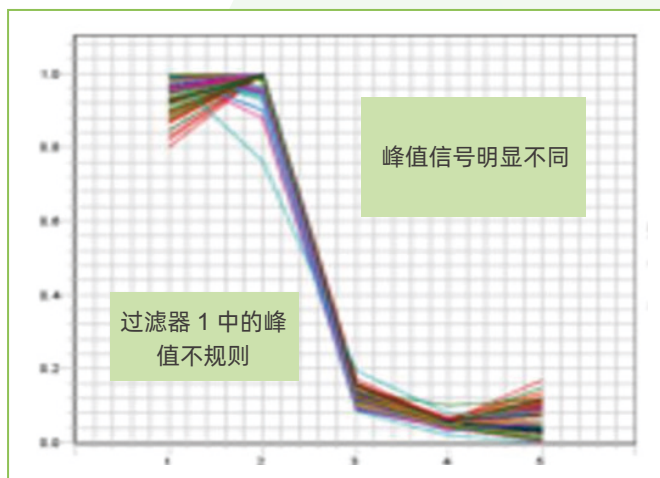


🔔 应亲自检查校准光谱

染料校准较差

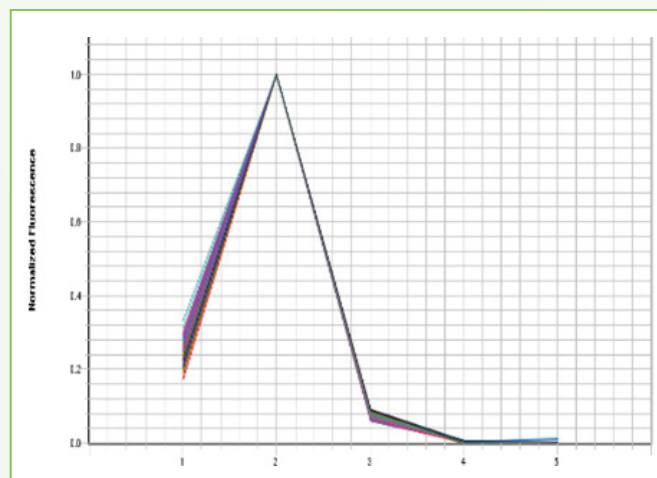
非光学级封板膜

CFG540 (Y-靶) 光谱较差



使用 Eppendorf PCR 干净的封板膜（非光学级）密封反应板

CFG540 光谱良好



使用 MicroAmp® 光学封板膜（Applied Biosystems）密封反应板

建议使用反应板：MicroAmp® 光学 96 孔反应板（Applied Biosystems）

🔔 使用建议的反应板和封板膜

IPC 值不明确

由于反应密封不严导致蒸发

1			Settings											
2			IPC Shift Threshold	M/F mixture Threshold	Deg Threshold		Autosomal	Degradation	IPC	Y				
3			0,3	2	2		Autosomal	Degradation	IPC	Y				
4														
5	Well	Sample Name	[Auto]	[Deg]	[Y]	IPC Cq	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto]/[D]	[Auto]/[D] Threshold		
56	G3	2FM_P_dj3_G	0,0052	0,0026	0,0002	21,46	0,50	At or Above	26,48	At or Above	2,02	At or Above		
57	G4	2FM_P_dj3_G	0,0055	0,0034	0,0002	21,03	0,07	Below	31,71	At or Above	1,63	Below		
58	Average	2FM_P_dj3_G	0,0054	0,0030	0,0002	21,25	0,29	Below	28,94	At or Above	1,80	Below		

蒸发导致 PowerQuant® System 重复样本中 IPC 值出现显著差异。

 确保反应板密封得当，防止蒸发

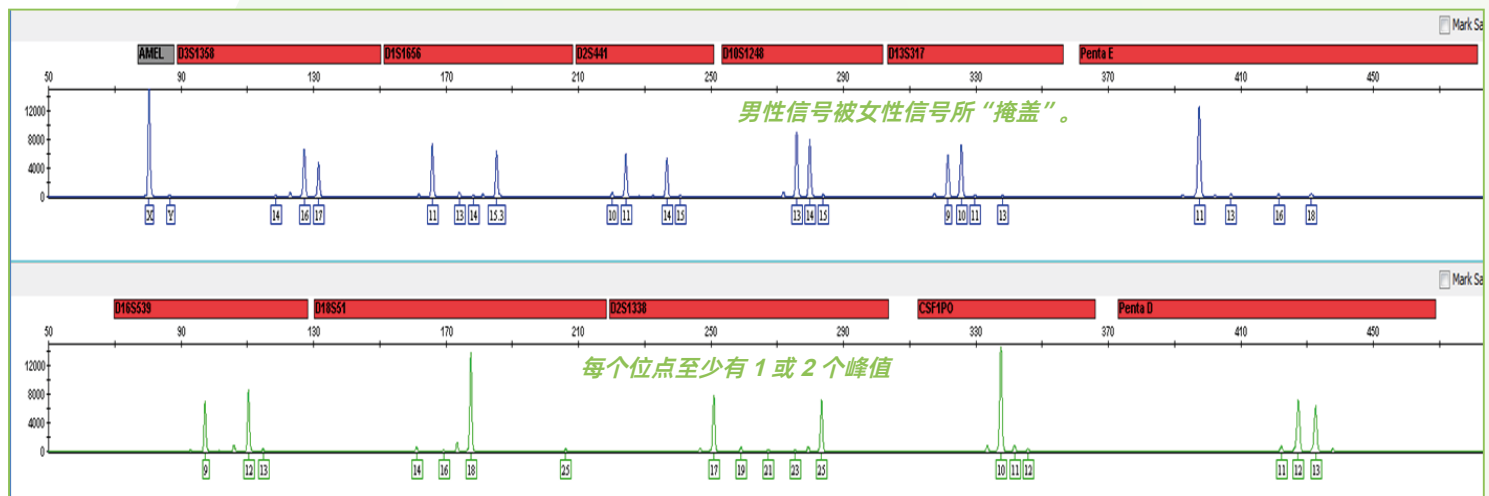
用 PowerQuant® System 结果展示下一步骤

PowerQuant® System 提供下一步骤的指示说明

PowerQuant结果	下一首选步骤
优质DNA	常染色体STR扩增
具有高过量女性DNA的女性-男性混合物	Y-STR扩增
轻度至中度降解	使用高于正常模板量扩增
轻度至中度抑制剂残留	稀释DNA
抑制剂残留过高	DNA再纯化
Zero Quant或高降解	无进一步处理。不要浪费时间和试剂。

混合 STR 图谱中“隐藏的”男性等位基因

男性 - 女性 DNA 混合物中的过量女性 DNA

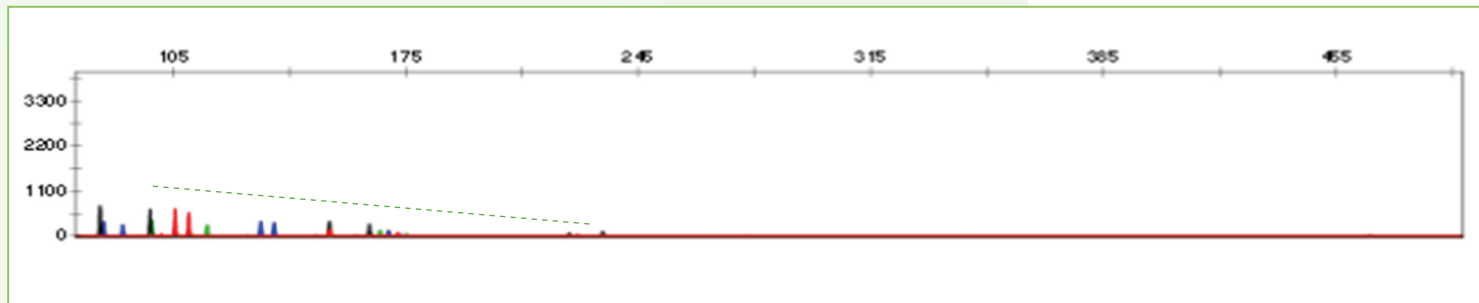


PowerPlex® Fusion System (仅蓝色和绿色通道) 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

🔔 可：进行 Y-STR 扩增，只关注男性等位基因。

STR 图谱中的斜坡式下降（性别位点不受影响）

轻度至中度降解 DNA



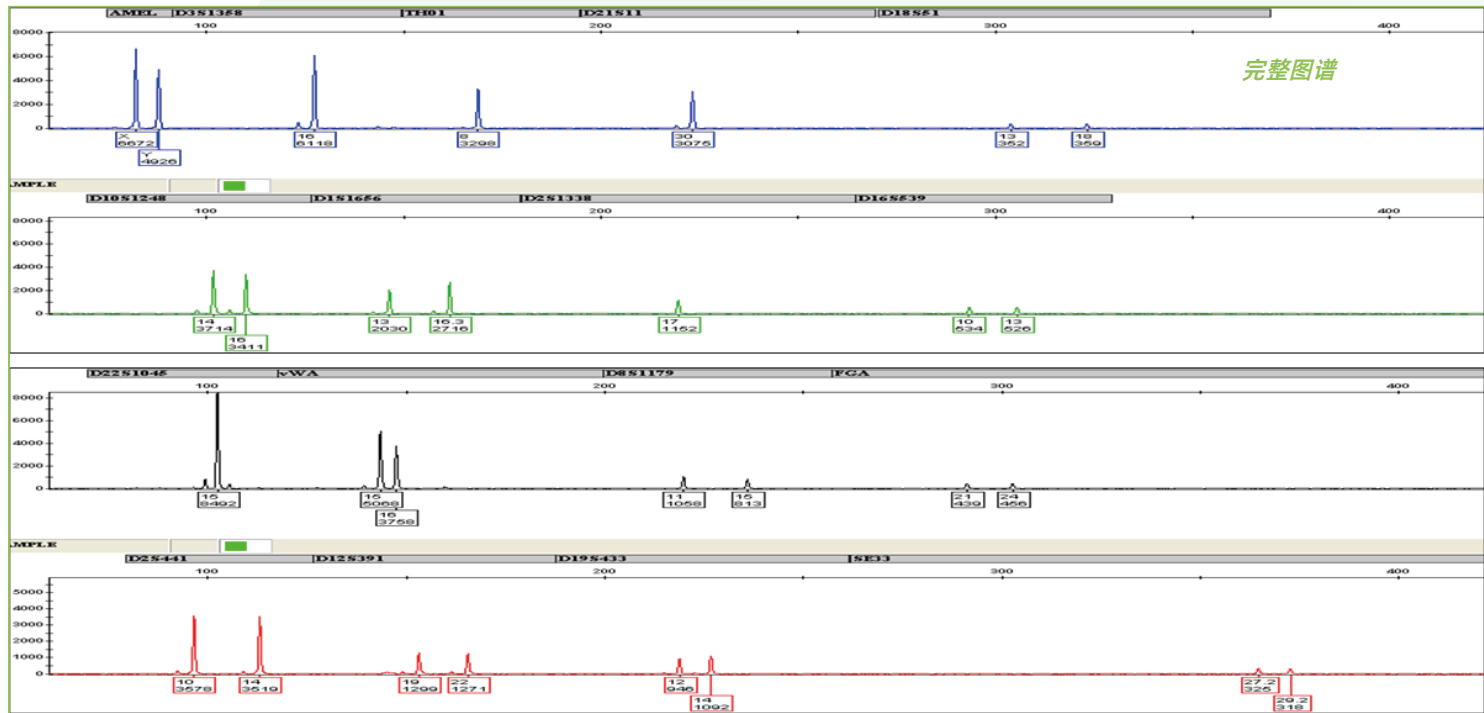
PowerPlex® Fusion System. 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

如果定量结果显示轻度至中度 DNA 降解，应如何去做？

🔔 PCR 扩增时添加更多 DNA 模板

轻度至中度降解 DNA

向 PCR 中添加更多模板



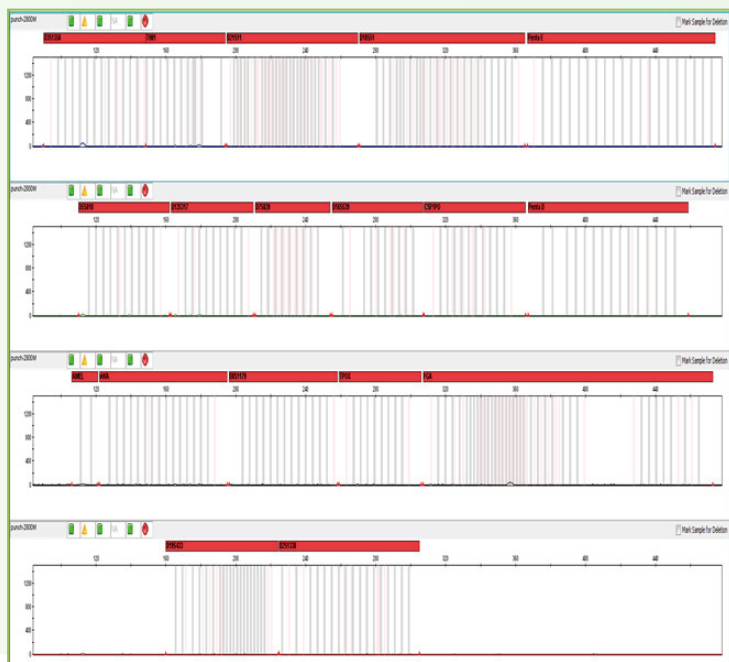
PowerPlex® ESX 17 System 用 1.5ng DNA 代替 0.5ng DNA 进行反应。使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

数据由 Antonio Alonso, Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Department of Biology, Madrid, Spain 提供。

轻度至中度抑制剂残留

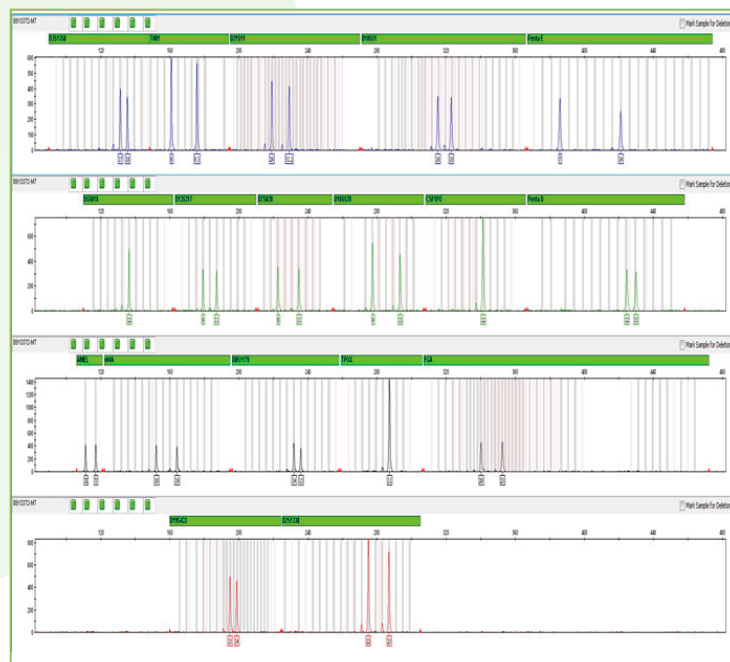
总 PCR 抑制剂量

未稀释的 DNA 样本



PowerPlex® 18D System

1:10 稀释的 DNA 样本

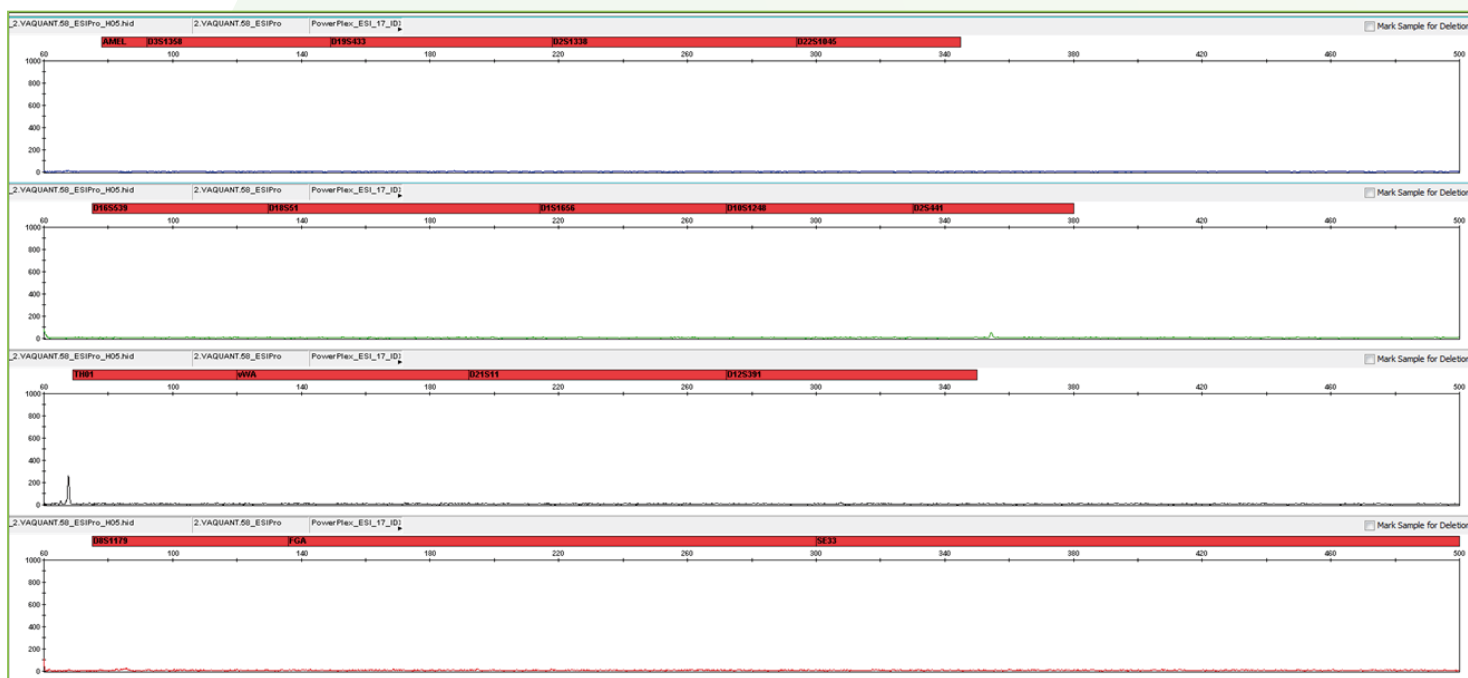


PowerPlex® 18D System. 1: 10 稀释的相同样本

使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物（3kV 进样电压、5 秒进样时间）。

无 STR 图谱

样本中无 DNA



PowerPlex® ESI 17 Pro System 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物（3kV 进样电压、5 秒进样时间）。

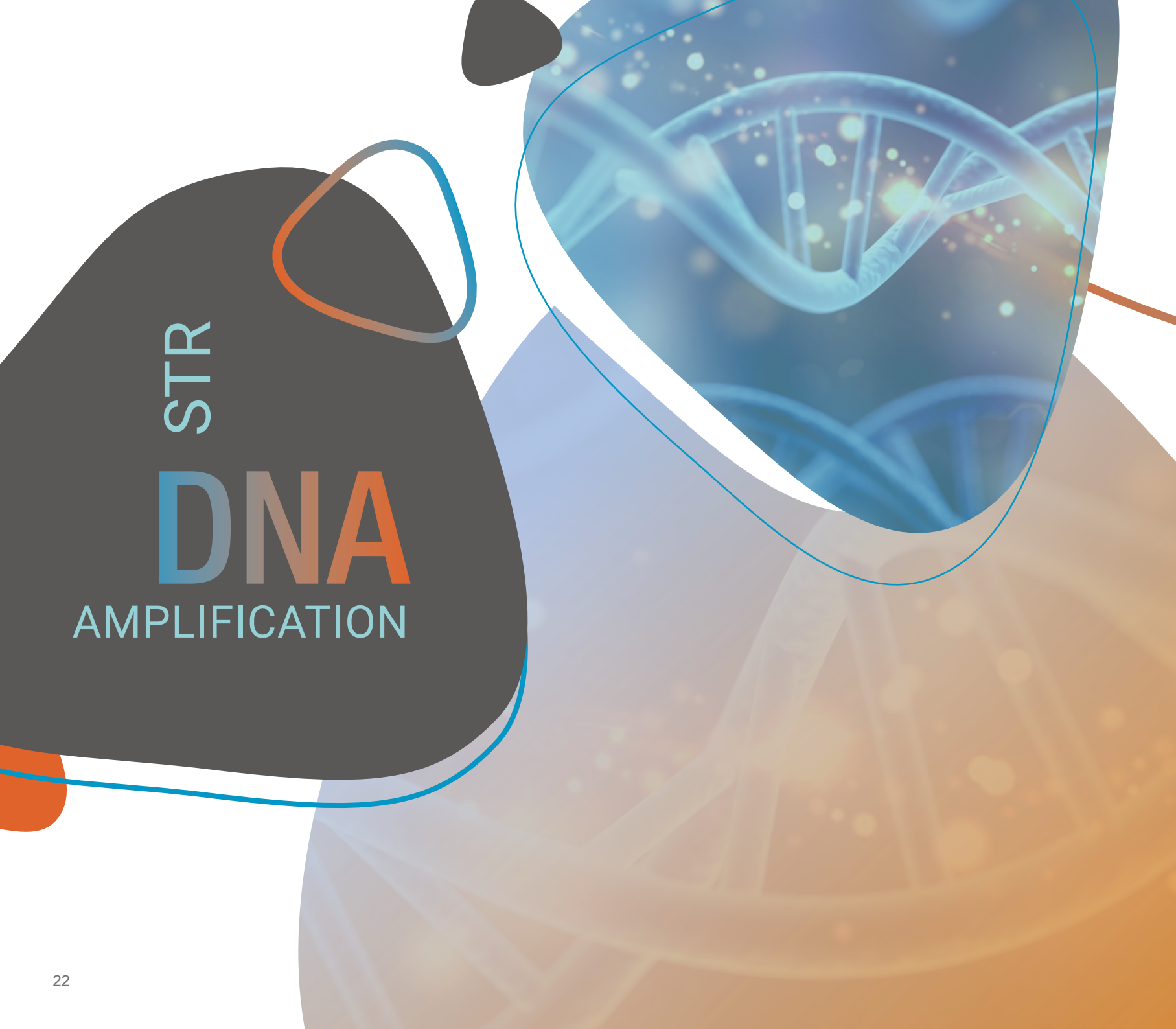
自动定量 (ng/μL)

0.000

Y 定量 (ng/μL)

0.000

🔔 确认 Zero Quant 结果。

An abstract graphic featuring a DNA double helix structure. A magnifying glass with a blue frame and handle is positioned over the DNA, focusing on a specific section. The background is a mix of blue and orange gradients with bokeh light effects. On the left, a dark grey rounded shape contains the text 'STR DNA AMPLIFICATION'.

STR DNA AMPLIFICATION

STR 分析疑难解答

DNA 扩增

- 使用建议的热循环仪和循环方案
- 使用建议的塑料耗材
- 充分涡旋
- 注意准确移液
- 不可提前制备扩增混合液

PowerPlex® Amplification

建议的循环情况

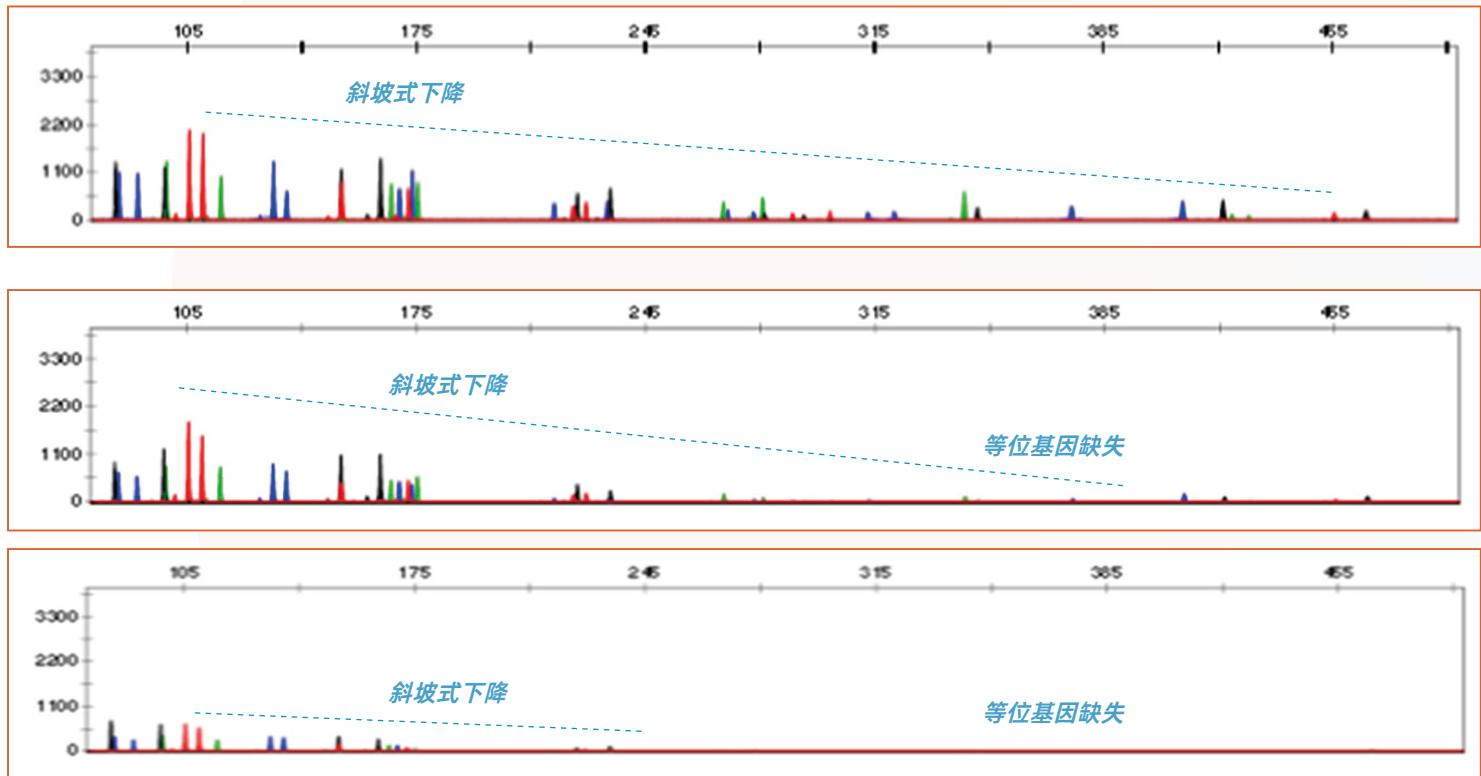
PowerPlex® System	16 HS	ESX & ESI	ESX Fast & ESI Fast	18D	21	Y23	Fusion	Fusion 6C
建议的热循环仪	9700 9600	9700 Veriti	9700 Veriti	9700 Veriti	9700 Veriti	9700 Veriti	9700 Veriti	9700 Veriti
“Modi” 中给出的升降温速率	9600模式*	9600模式	最大模式	9600模式	最大模式	最大模式	最大模式	最大模式 100% (Veriti)

* 另外，根据 PCR 每一步骤的需要修改升降温速率

9600 模式 =1°C /Sec
最大模式 =4°C /Sec

STR 图谱中的斜坡式下降（性别位点未受影响）

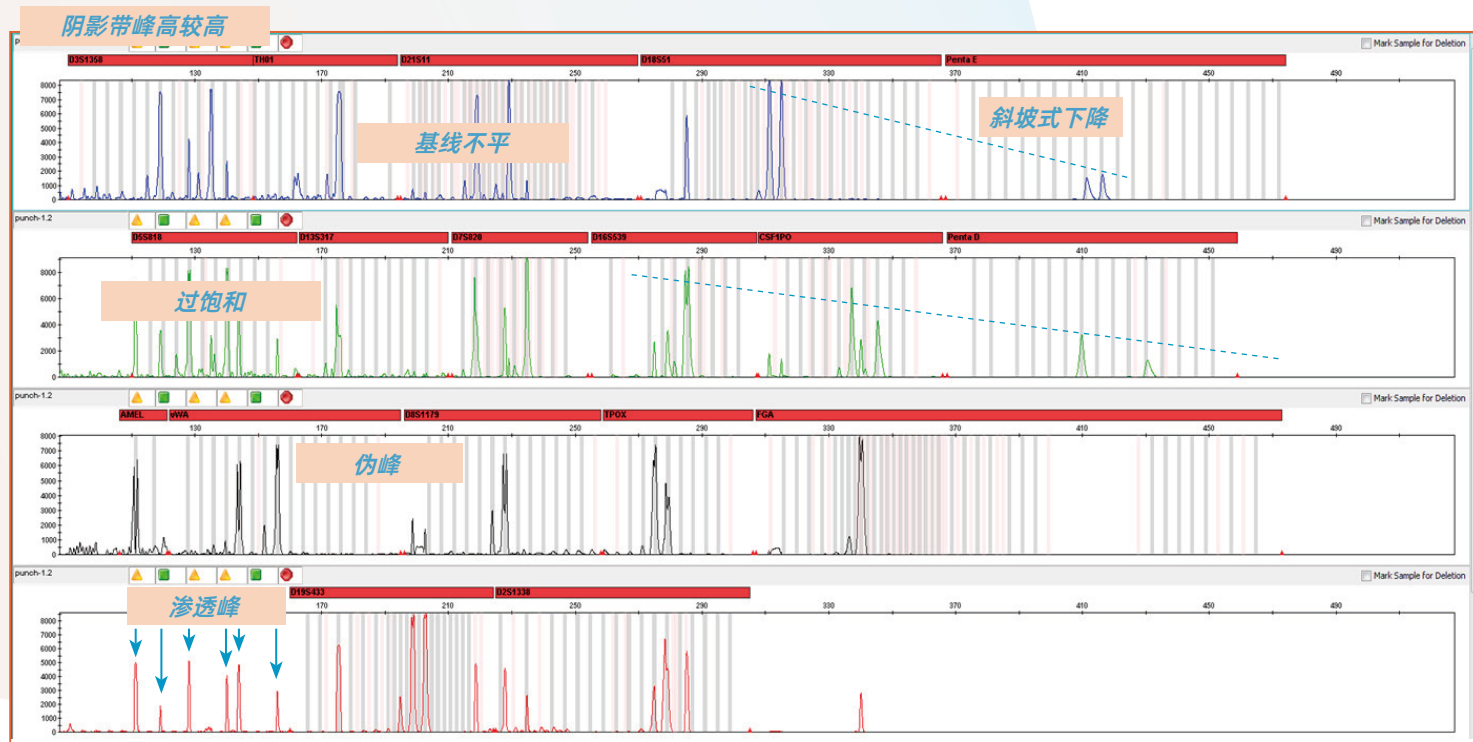
降解 DNA



PowerPlex® Fusion System. 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

噪音干扰的 STR 图谱

添加至 PCR 的 DNA 模板过多

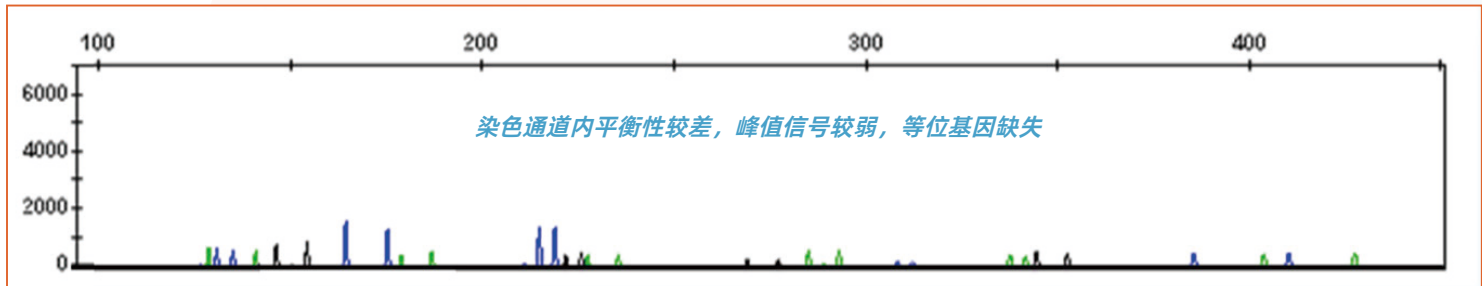


PowerPlex® 18D System 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物（3kV 进样电压、5 秒进样时间）。

🔔 一旦知晓样本中 DNA 浓度，可避免 PCR 出现较差结果。

不平衡的 STR 图谱中峰值高度较低

添加至 PCR 的 DNA 模板不足



PowerPlex® 21 System. 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

🔔 一旦知晓样本中 DNA 浓度，可避免 PCR 出现较差结果。

PowerPlex Amplification

建议的热循环仪

- **GeneAmp® PCR System 9700** 热循环仪与银质或银质镀金样品模块配套使用 (Applied Biosystems)
- **Veriti® 96-Well Thermal Cycler** (Applied Biosystems)
- **ProFlex PCR System** (Applied Biosystems)

如适用的仪器不是建议的热循环仪，请将斜坡率调至：

9600 模式 = 1°C /Sec

最大模式 = 4°C /Sec

🔔 **请注意：**不建议在铝制加热模块的热循环仪上使用 PowerPlex® Systems。

建议使用的塑料耗材

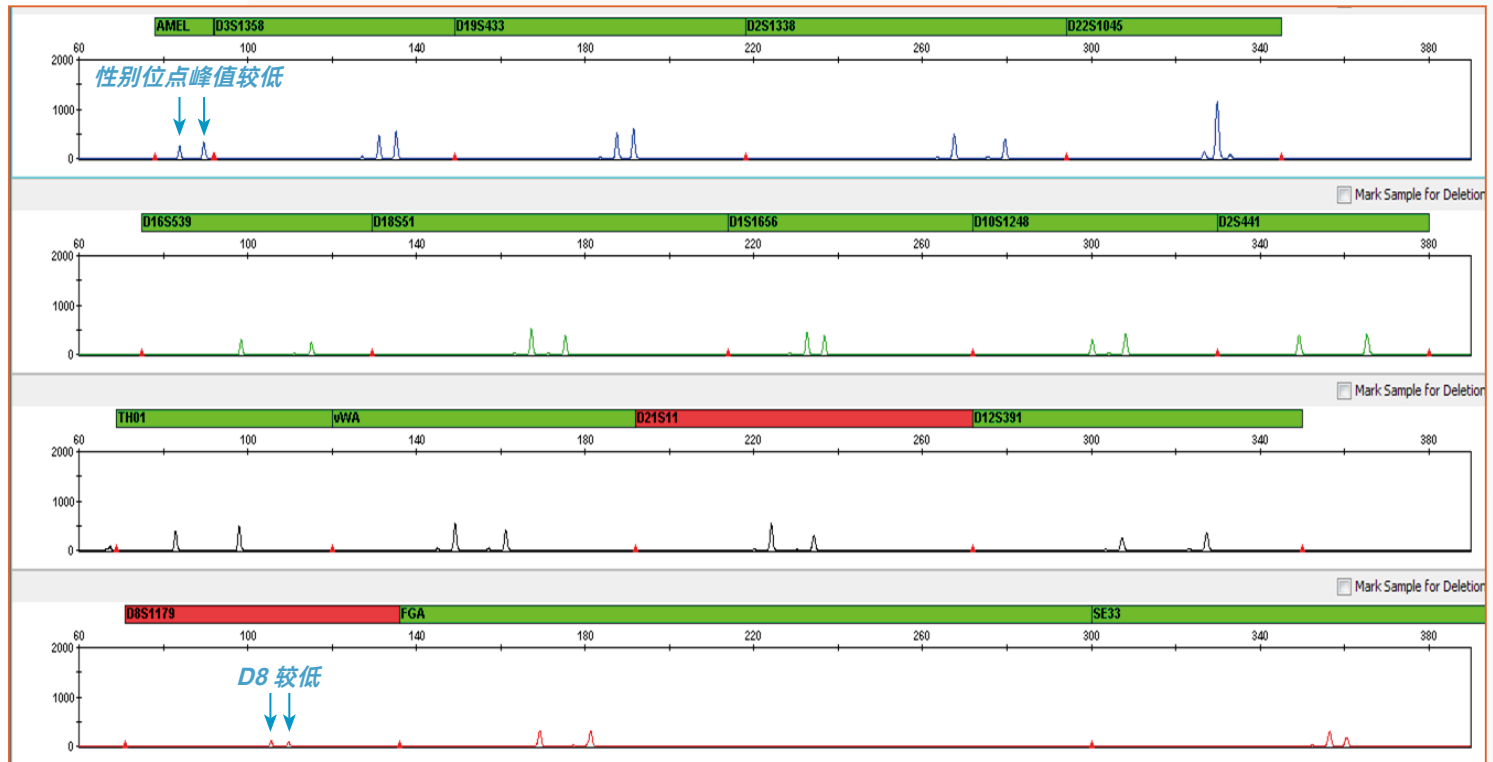
- **MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates**
(Applied Biosystems)
- **0.2 mL MicroAmp® Reaction Tubes**
(Applied Biosystems)

除了这些铺板外，其他铺板可能由于塑料材料、厚度和孔形状的差异而产生不同的传热速率。

传热速率降低的影响

使用替代的循环仪和塑料耗材

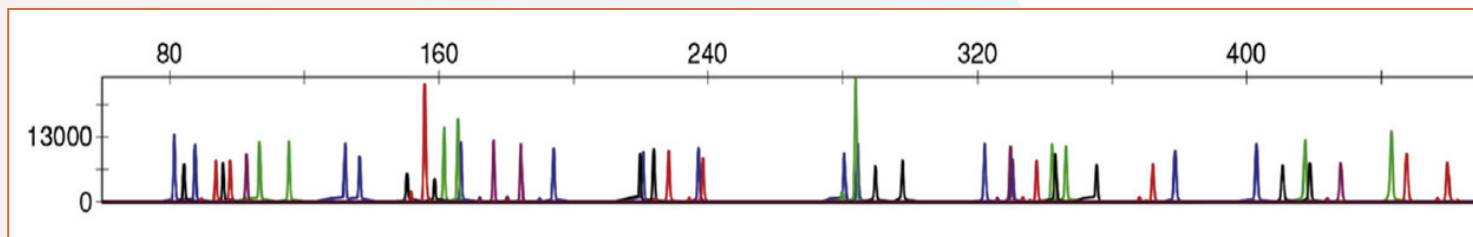
性别位点和 D8S1179 的扩增特别差



PowerPlex® ESI 17 Pro System 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。使用带有铝制加热模块和 4titude® 的 Framestar 96 半裙板进行 PCR。

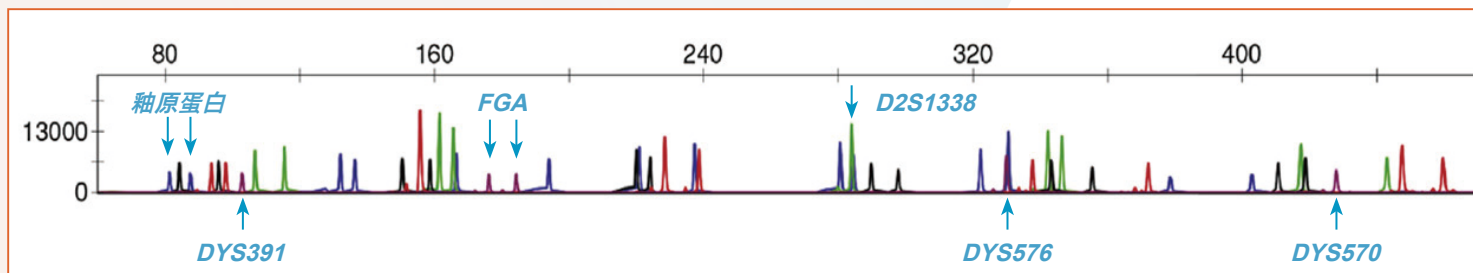
传热速率降低的影响

使用其他建议的 96 孔扩增板



MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate

由于使用了其他品牌的扩增板，导致某些位点扩增效果变差

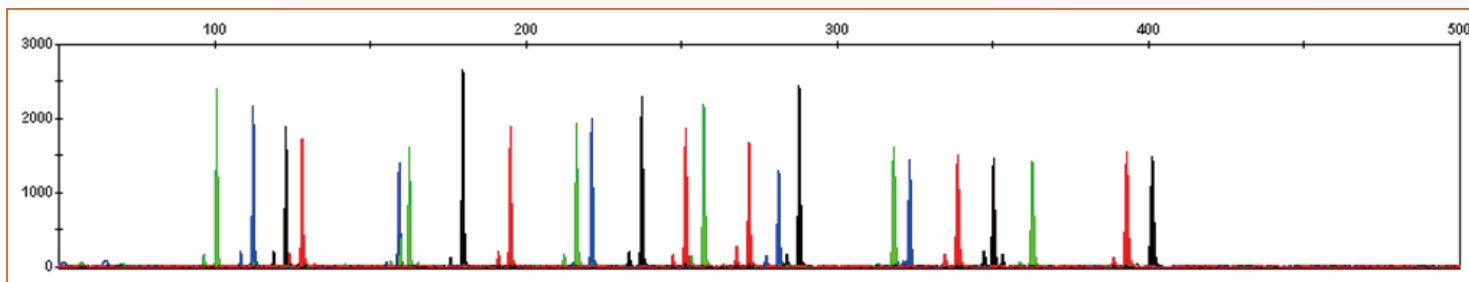


Axygen® Scientific 96-Well PCR Plate

PowerPlex® Fusion 6C System 试剂盒使用 GeneAmp® 9700 扩增仪的 Max 模式扩增和 Applied Biosystems® 3500 测序仪电泳扩增产物（1.2kV 进样电压、24s 进样时间）。

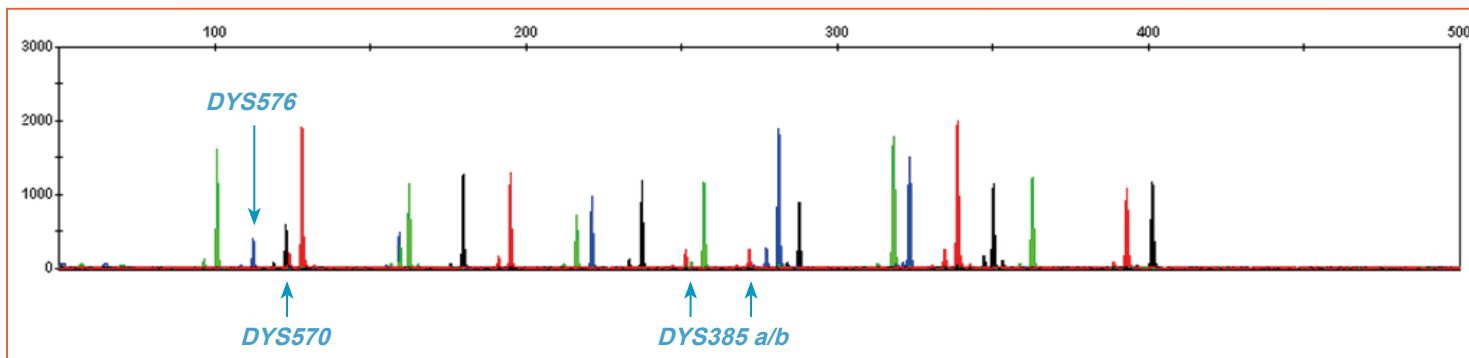
传热速率降低的影响

使用其他建议的 96 孔扩增板



MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate

由于使用了其他品牌的扩增板，导致某些位点扩增效果变差



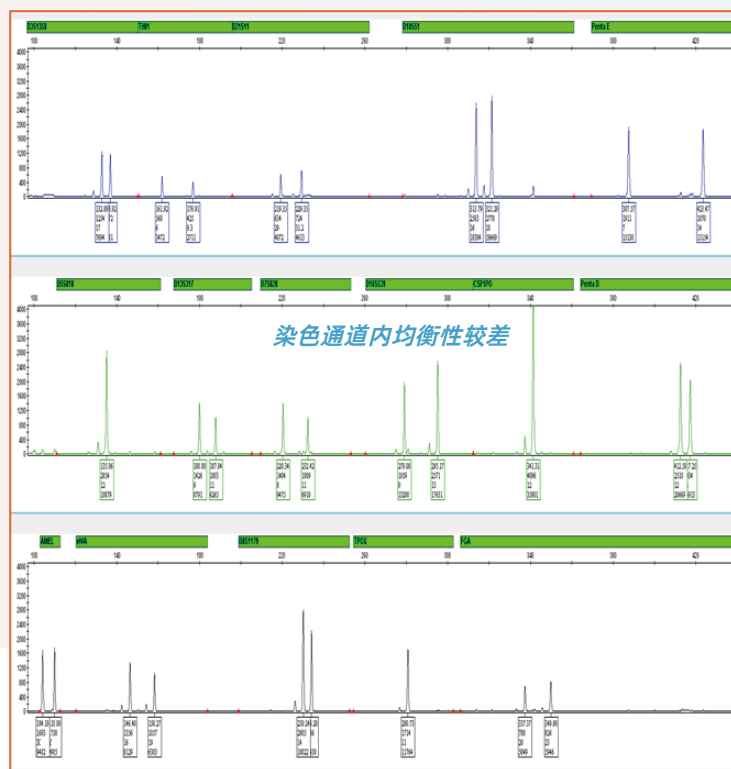
Axygen® Scientific 96-Well PCR Plate

PowerPlex® Y23 System 试剂盒使用 GeneAmp® 9700 扩增仪的 Max 模式扩增和 Applied Biosystems® 3500 测序仪电泳扩增产物（1.2kV 进样电压、24s 进样时间）。

不平衡的图谱

引物对混合物未充分涡旋震荡

未涡旋震荡的引物对混合物



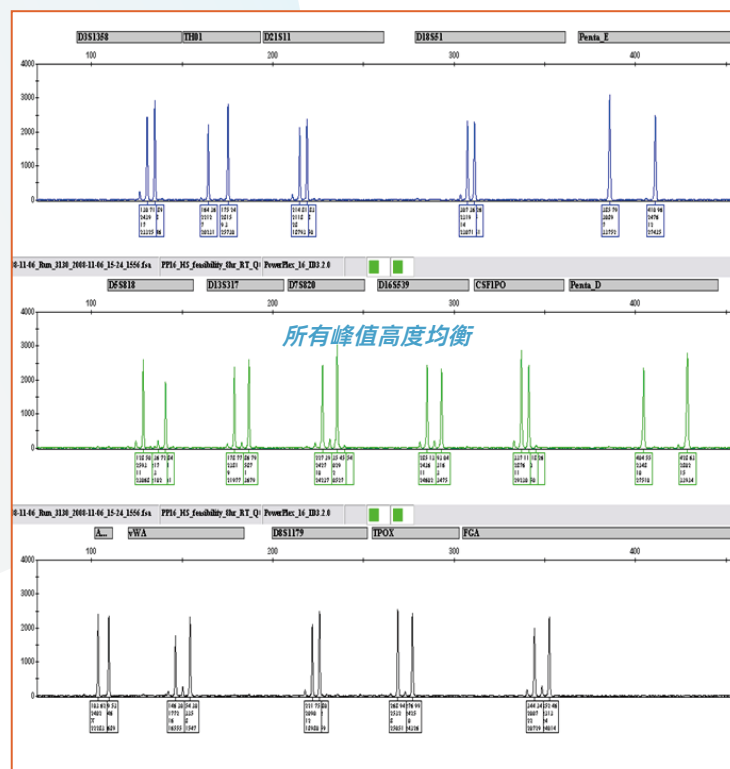
Primer Pair Mix 相关知识

储存在 -20℃ 的条件下，可导致引物对混合物中形成梯度！

因此，需要进行以下步骤：

- 完全解冻
- 充分涡旋震荡（10-20 秒）！
- 涡旋后不可离心！

经过 15 秒涡旋震荡后的引物对混合物

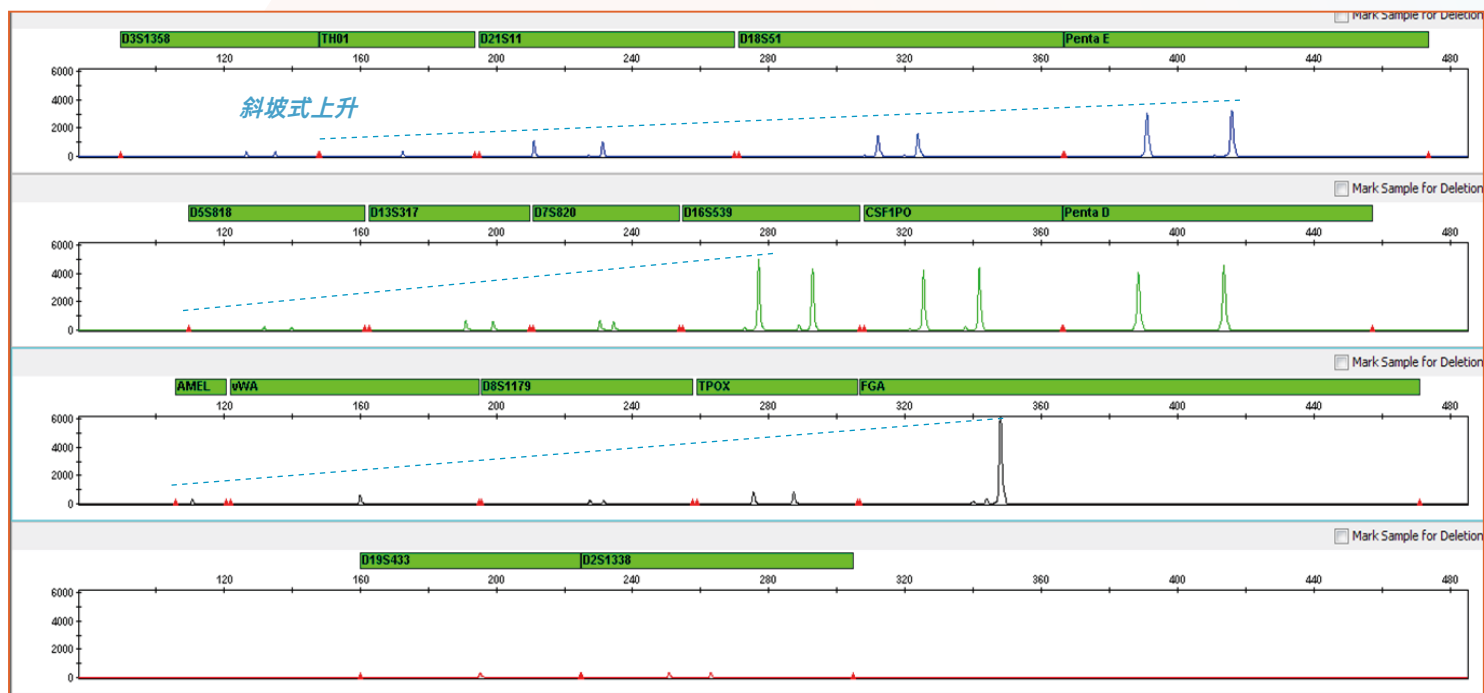


PowerPlex® 16 HS System 试剂盒使用 Applied Biosystems® 3130xl 测序仪电泳扩增产物（3kV 进样电压、5 秒进样时间）。

充分涡旋震荡！

移液不准确的影响

引物对浓度较低



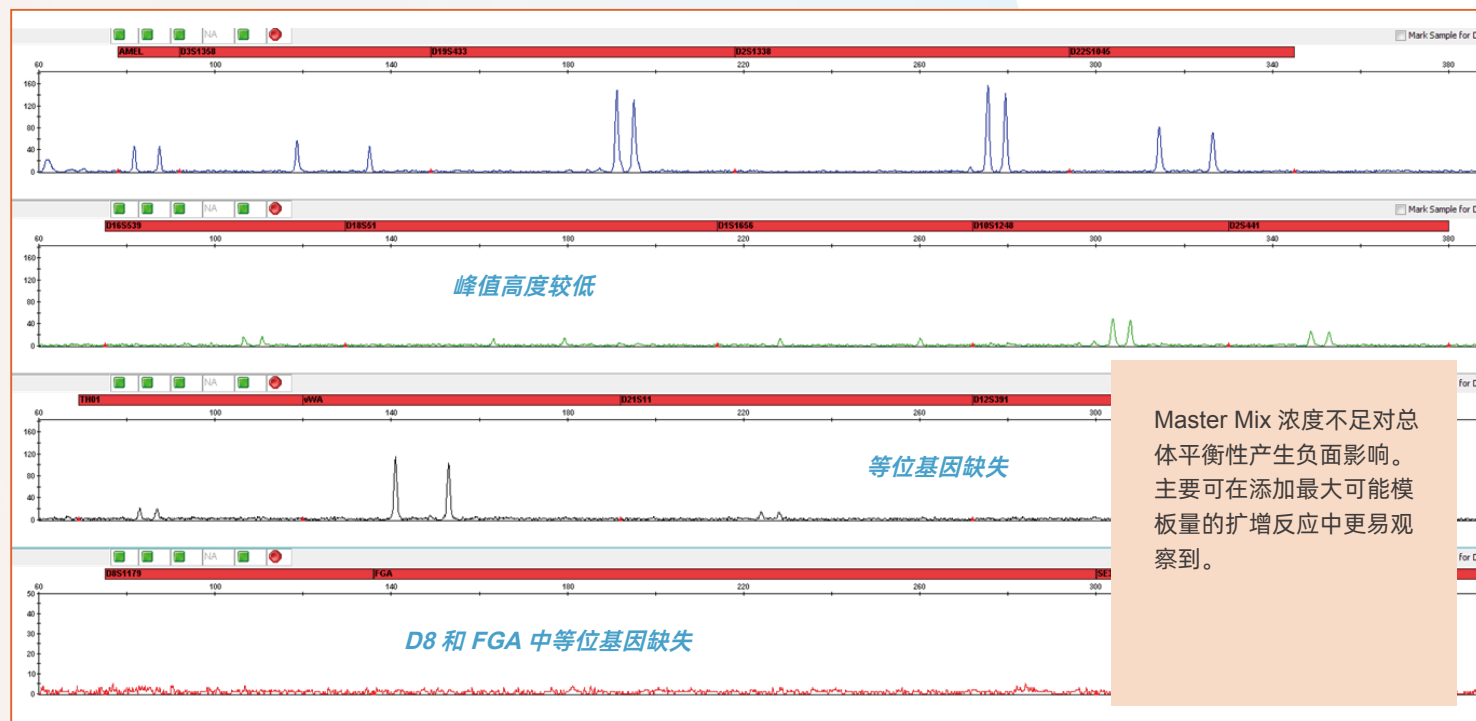
PowerPlex® 18D System 试剂盒仅用一半浓度的引物对混合物（用 0.5 X 替代 1 X）时，使用 Applied Biosystems® 3500 测序仪电泳扩增产物（1.2kV 进样电压、24s 进样时间）。

引物对浓度不足可对低分子量标志物扩增产生负面影响。

🔔 注意准确移液！

移液不准确的影响

Master Mix 含量过低



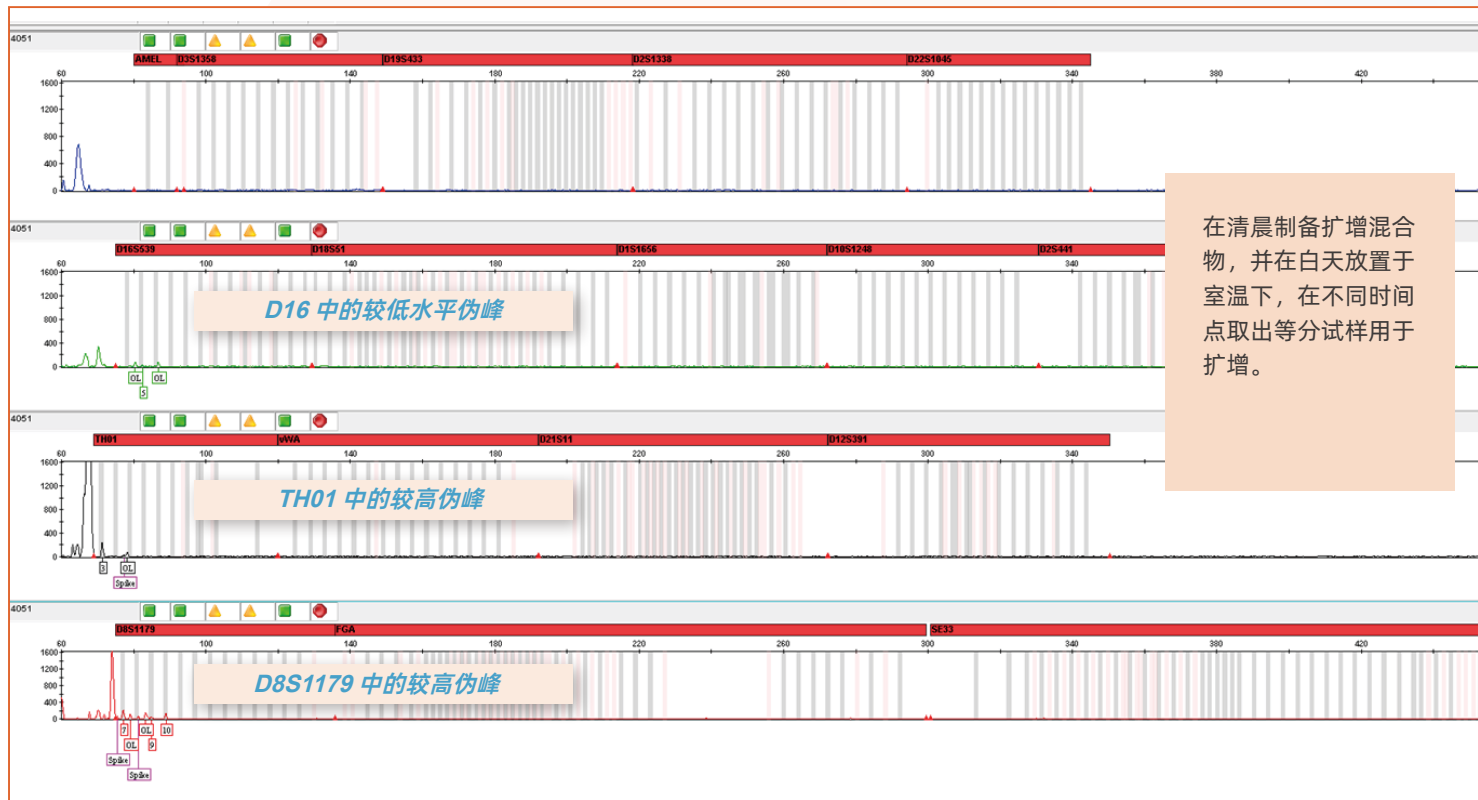
PowerPlex® ESI 17 System 试剂盒使用 Applied Biosystems® 3500 测序仪电泳扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

🔔 注意准确移液！ Master Mix 粘性大于引物对混合物。缓慢移液！

制备扩增混合物太久产生的影响

STR 图谱的伪峰

带有伪峰的阴性扩增对照



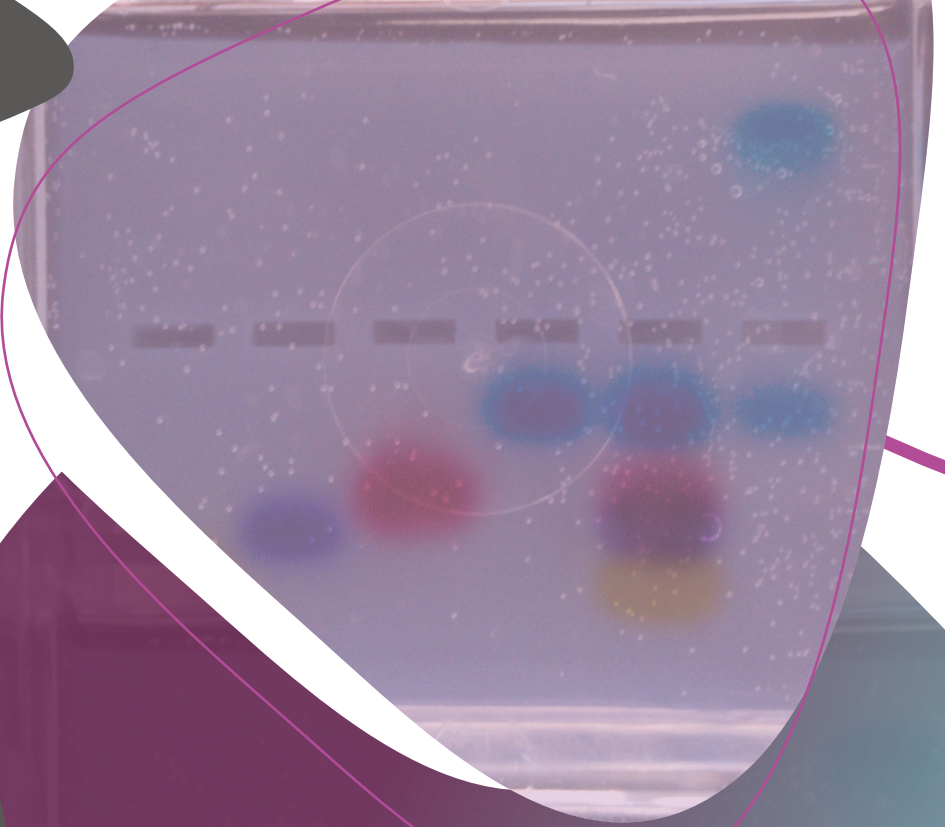
在清晨制备扩增混合物，并在白天放置于室温下，在不同时间点取出等分试样用于扩增。

PowerPlex® ESI 17 Fast System，阴性扩增对照。使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

🔔 PCR 扩增混合物不可长时间储存。

STR DNA

SEPARATION
& DETECTION



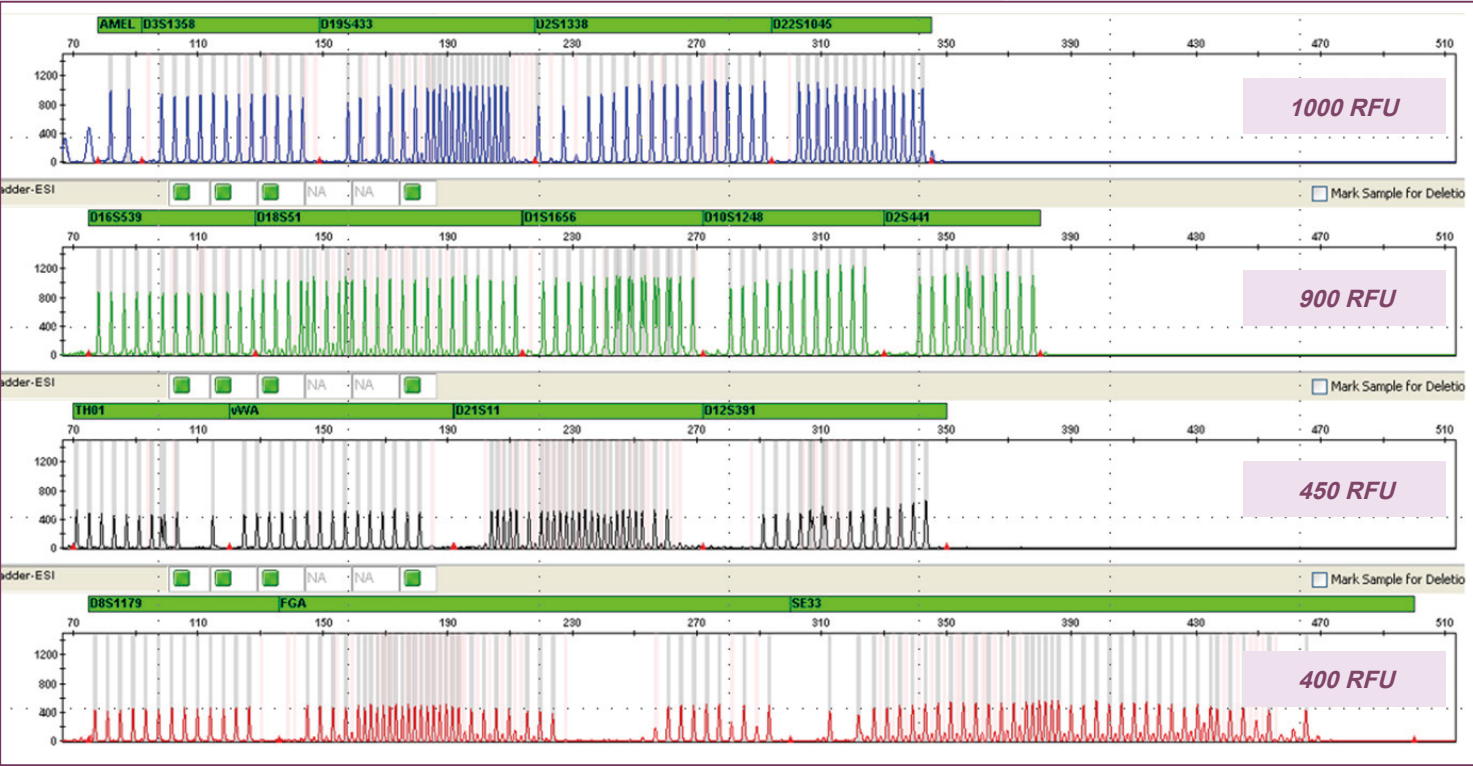
STR 分析疑难解答

DNA 分离与检测

- 使用建议的 dye set
- 使用建议的胶类型
- 使用去离子甲酰胺
- 不要提前制备加样混合物
- 不要储存 2800M DNA 的稀释液
- 遵照 CE 仪器的供应商建议的维护程序

染色通道的不均衡性

错误的 dye set



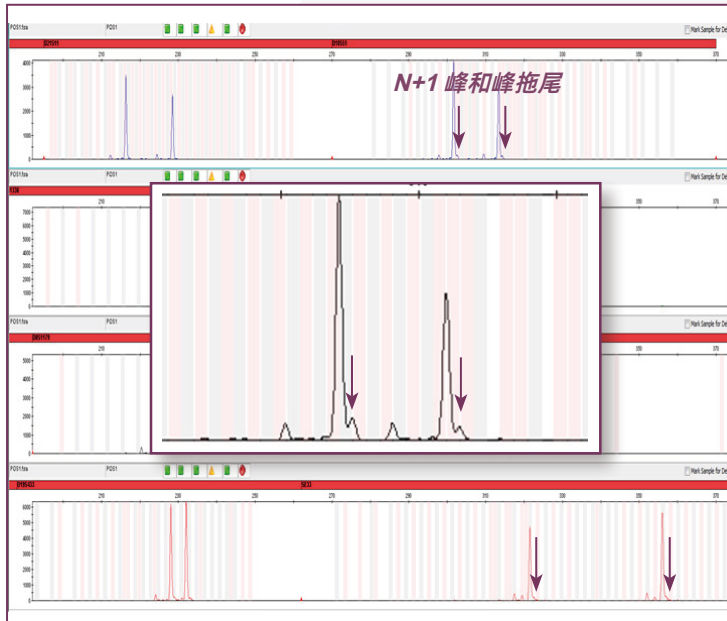
PowerPlex® ESI 17 System 试剂盒使用 Any5Dye, Allelic Ladder 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物 (1.2kV 进样电压、24s 进样时间)。

🔔 对每种成分使用建议的 dye set !

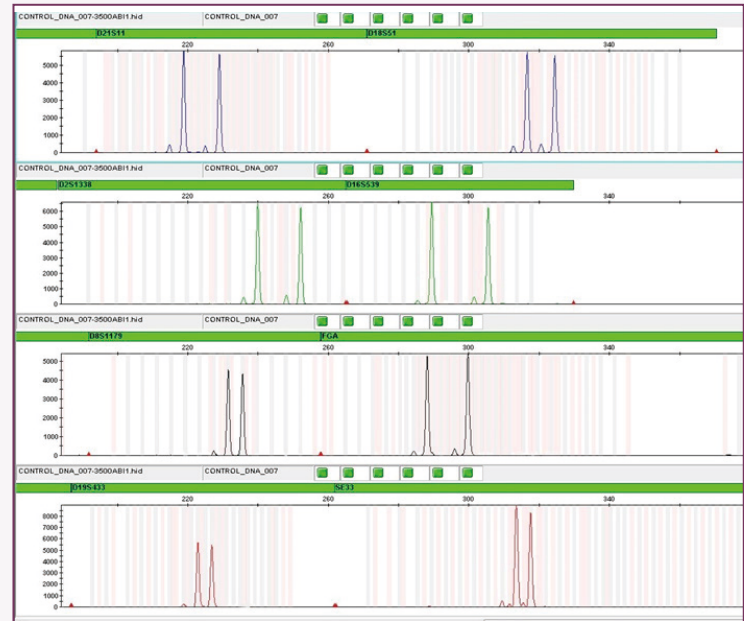
建议的染色套组概述	
PowerPlex® Dye Chemistry	dye set
4C	F
5C	G5
6C	J6

STR 图谱的 N+1 伪峰

使用非建议的胶和毛细管长度



007 DNA
POP6
50cm 毛细管



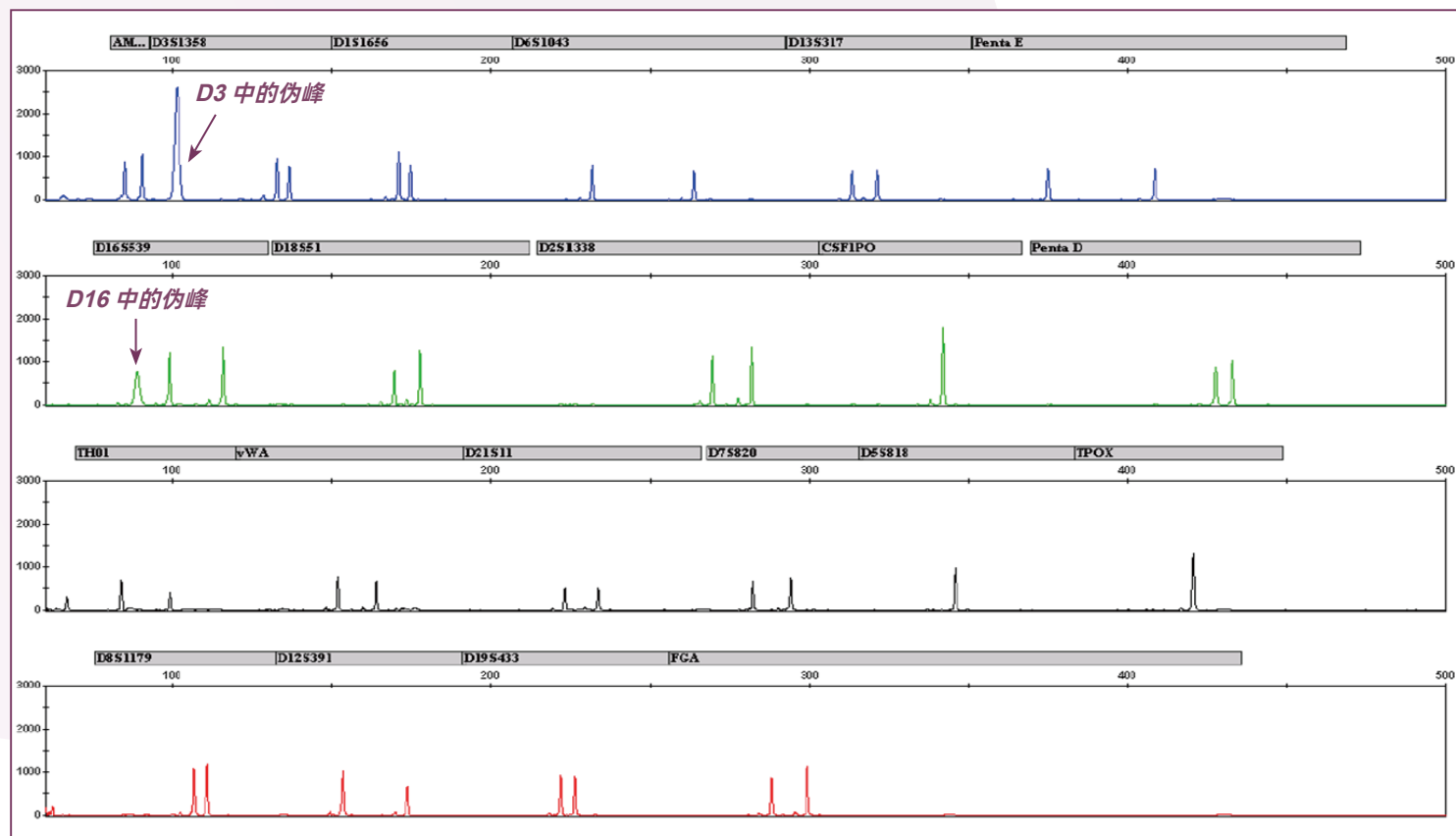
2800M DNA
POP4
36cm 毛细管

PowerPlex® ESX 17 Fast System 试剂盒使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物 (1.2kV 进样电压、24s 进样时间)。

🔔 POP4 和 36cm 毛细管与 PowerPlex® STR Systems 一起配套使用

STR 图谱的伪峰

使用非建议的胶



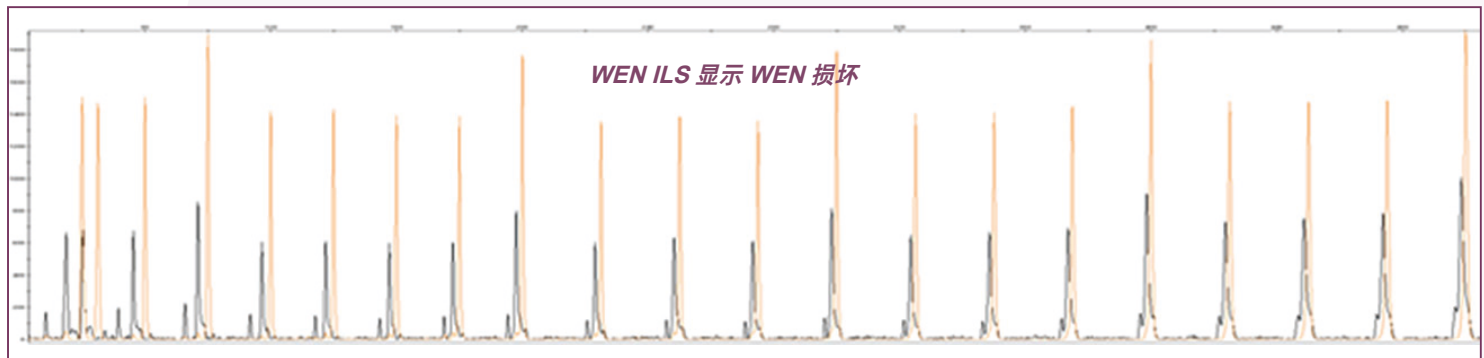
POP7 中的 PowerPlex® 21 System 使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离扩增产物（1.2kV 进样电压、24 秒进样时间）。

使用 POP7，伪峰迁移至 D3 和 D16

🔔 建议使用 POP4 更适用于 PowerPlex® STR Systems

加样混合物预制备的影响

WEN ILS500 的降解



使用 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer 分离 **WEN ILS 500** (1.2kV 进样电压、24 秒进样时间)。

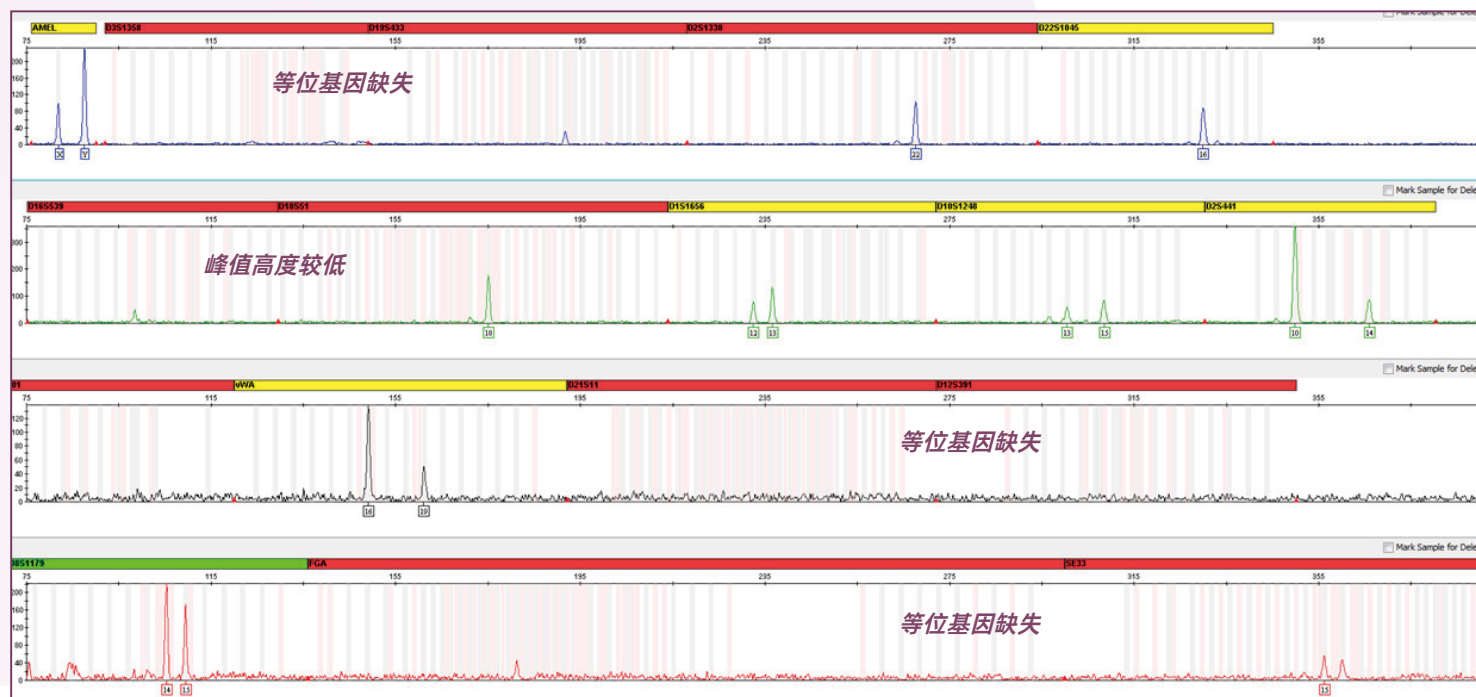
预混合甲酰胺和 WEN ILS500,
并放置于 4°C 下保存

 加样混合物不可长时间储存

稀释和储存对 2800M DNA 的影响

对照 DNA 的降解

阳性扩增对照显示降解迹象



PowerPlex® ESI 17 Fast System 使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离扩增产物 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

将 2800M DNA 稀释液放置于 4°C 下存储
2800M DNA 稀释液显示降解迹象

🔔 请注意：对照 DNA 稀释于水中时是不稳定的！

耗材或毛细管阵列陈旧导致分离度较差

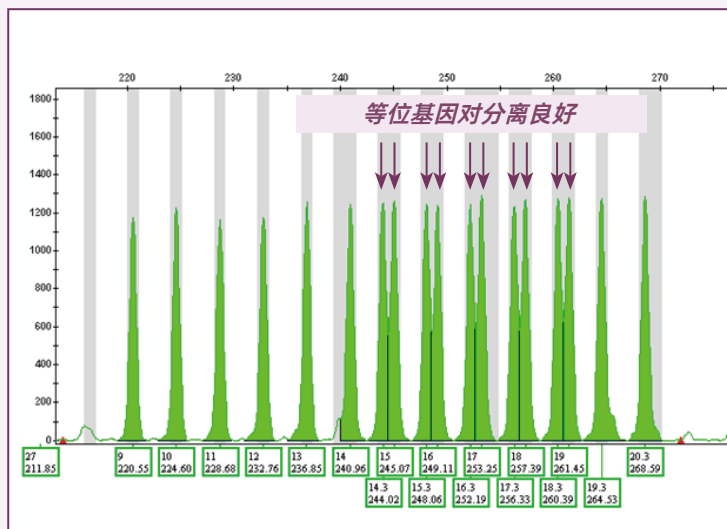


43

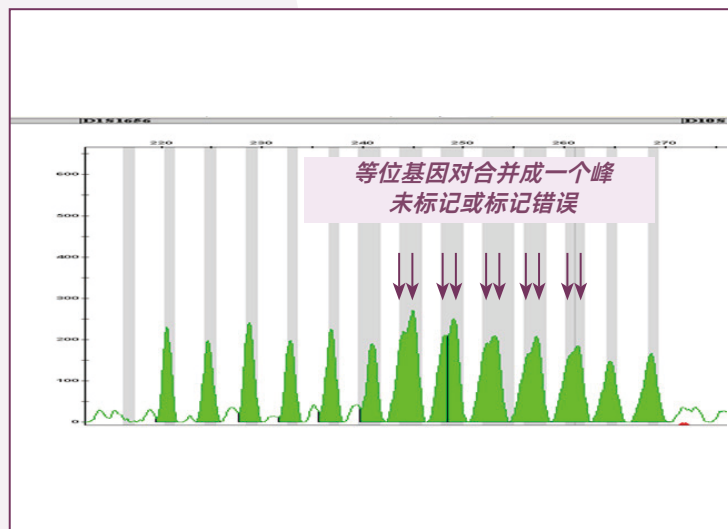
含有错误标记的等位基因的 STR 图谱

耗材或毛细管阵列陈旧导致分离度较差

分离度良好



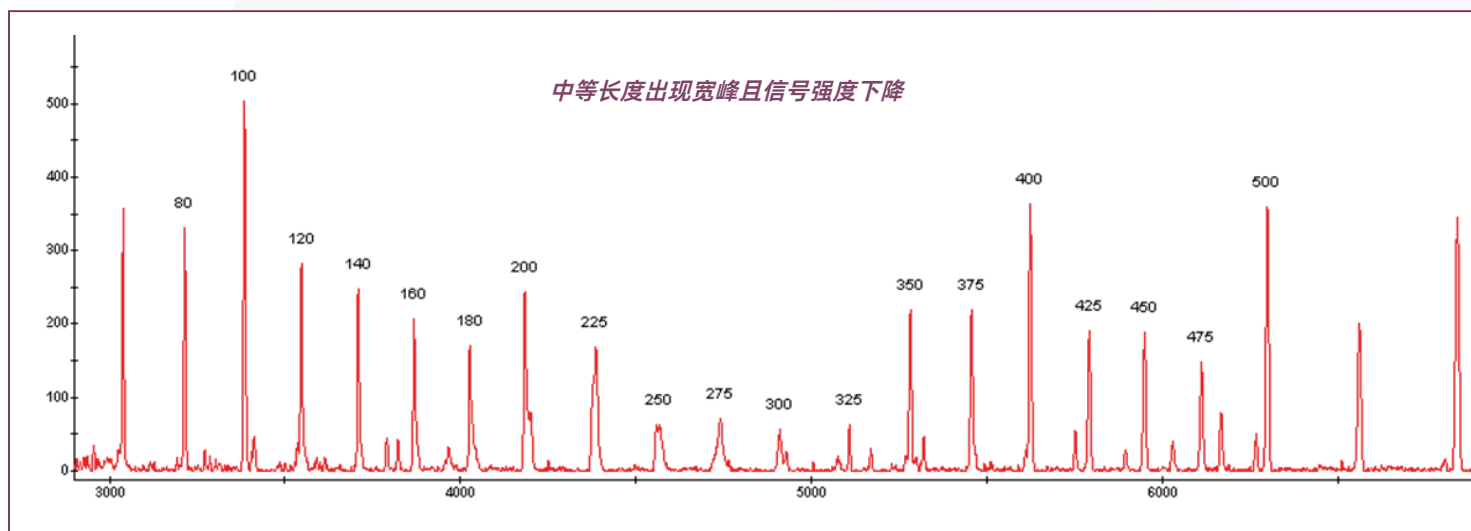
分离度较差



PowerPlex® ESI Systems 中的 D1S1656 位点

金门效应

甲酰胺质量较差



使用 Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyzer 分离 ILS600 (3kV 进样电压、5 秒进样时间)。

🔔 甲酰胺质量较差导致金门效应

甲酰胺相关

- 甲酰胺可致 DNA 样本变性
- 甲酰胺具有吸湿性，即从空气中吸收水分。随着时间的推移，甲酰胺会降解成甲酸和氨，其传导性增加。
- 电导率大于 100 μ S/cm 的甲酰胺在进样过程中与 DNA 片段竞争。



 如果无法确定甲酰胺质量是否较差，可使用扩增级的水替换加载混合物中的甲酰胺进行对比。

如果使用水的峰值高度高于甲酰胺，可知甲酰胺的电导率过高。

- 使用去离子甲酰胺
- 减少暴露于空气中
- 在 -20 $^{\circ}$ C 下等分保存
- 一次仅使用一个等分试样
- 等分试样不可二次冷冻

维护 CE 仪器

仪表维护时间表

CE	更换缓冲液	更换胶	水冲洗泵组	冲洗水陷阱	更换毛细管阵列
Applied Biosystems® 3130, 3130xl Genetic Analyzers	每48小时	每周	每周	每月	进样100次后
Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzers	每周	每周	每周	每月	进样160次后
Spectrum Compact CE System	14天后或进样80次后	14天后或进样80次后	—	—	进样200次后

 完全遵照维护时间表



STR

ANALYSIS

TROUBLESHOOTING

普洛麦格（北京）生物技术有限公司

地址：北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

传真：010-58256160

网址：www.promega.com



Promega 遗传鉴定公众号
您身边的法庭科学家