[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810128822.2

[43] 公开日 2008 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 101323880A

[22] 申请日 1997.4.15
[21] 申请号 200810128822.2
分案原申请号 97194967.0
[30] 优先权
[32] 1996. 4.15 [33] US [31] 08/632,575
[71] 申请人 普罗梅加公司
地址 美国威斯康星州
[72] 发明人 詹姆斯·W·舒姆
凯瑟琳·A·米卡 唐·R·拉巴契
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红
权利要求书 2 页 说明书 72 页 附图 19 页

[54] 发明名称

短串联重复基因座的多重扩增

[57] 摘要

本发明涉及用 PCR 或其它扩增系统同时扩增多个独立的基因座，以在一个多重反应中确定在该多重反应中所含的每个基因座的等位基因。 所分析的基因座包括下述基因座：HUMvWFA31， HUMLIPOL， HUMBFXIII， HUMF13A01， HUMFESFPS， HUMTH01， HUMTPOX， HUMCSF1PO， D22S683， D20S481， D19S253， D17S1299， D17S1298， D16S753， D16S539， D16S490， D14S562， D14S548， D14S118， D13S317， D10S1299， D9S930，D7S820，D5S818，D4S2368，D3S1539。

1、一种同时确定来自一或多个 DNA 样品的至少 4 个短串联重复基因座中存在的等位基因的方法，包括：

a. 选择该 DNA 样品的能一起扩增的一套至少 4 个短串联重复基因座，其中该套基因座中的 3 个基因座是 D7S820、D13S317 和 D5S818；

b. 在一多重扩增反应中共扩增该套基因座，其中反应产物是从该套共扩增基因座的每个基因座扩增的等位基因的混合物；以及

c. 评价混合物中的扩增的等位基因以确定在该 DNA 样品内的该套基因座中所分析的每个基因座存在的等位基因。

2、权利要求 1 的方法，其中多重扩增反应是使用位于所分析的至少 4 个基因座两侧的至少 4 对引物进行的。

3、权利要求 2 的方法，还包括筛选用于多重扩增反应的引物对的步骤，所述引物对能从每个基因座产生当用凝胶电泳分离时与共扩增的该套基因座中的其它基因座的等位基因不重叠的等位基因。

4、权利要求 1 的方法，其中多重扩增反应是聚合酶链反应。

5、权利要求 1 的方法，其中通过将扩增的等位基因与分子量标准比较而评价扩增的等位基因，其中分子量标准选自 DNA 标记物和基因座特异性等位基因梯。

6、权利要求 1 的方法，其中用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等位基因并形成分离的等位基因的聚丙烯酰胺凝胶而评价扩增的等位基因。

7、权利要求 6 的方法，其中聚丙烯酰胺凝胶中的分离的等位基因通过用银染分析显色等位基因而确定。

8、权利要求 6 的方法，其中在共扩增基因座时使用能与该套基因座中的每个基因座两侧的区域结合的引物，其中在共扩增每个基因座中使用的至少一个引物具有与其共价附着的荧光标记，从而由其产

生的扩增的等位基因是荧光标记的，并且其中聚丙烯酰胺凝胶中的分离的等位基因通过用荧光分析显色等位基因而确定。

9、权利要求 8 的方法，其中荧光标记选自荧光素标记和四甲基罗丹明标记。

短串联重复基因座的多重扩增

本申请是申请日为 1997 年 4 月 15 日、申请号为 97194967.0、发明名称为“短串联重复基因座的多重扩增”的发明专利申请的分案申请。

相关申请的交叉参考

本申请是 1994 年 9 月 30 日申请的美国专利申请 08/316，544 的部分继续申请。该母申请的全文引入本文作参考。

关于联邦政府赞助的开发研究的声明

无。

发明背景

本发明一般地涉及对基因组系统中的遗传标记的检测，更具体地，本发明涉及用聚合酶链反应或其它扩增系统对多个独立的多态遗传基因座的同时扩增以在一个反应中确定在多重系统中所含的每个基因座的等位基因。

近年来，作为遗传标记的多态短串联重复序列(STR)的发现和开发刺激了下列方面的进展，即连锁图谱的开发、疾病基因的鉴别和鉴定以及 DNA 分型的简化和精确。

至少在人类基因组中的许多基因座含有多态 STR 区(Adamson，D.等，(1995)“从人类基因组中收集的有序四核苷酸重复标记”，美国人类遗传学杂志 57：619-628；Murray, J.C.等，(1994)“具有分摩密度的复杂人类连锁图谱”，科学 285：2049-2054；Hudson, T.J., Engelstein, M., Lee, M.K., Ho, E.C., Rubenfield, M.J., Adams, C.P., Housman, D.E., Dracopoli, N.C.(1992),“100 个高信息含量的人类简单序列重复多态性的分离和染色体定位”，(Genomics 13:622-629)。STR 基因座由长度为 3-7 个碱基对的短的重复序列元件组成。预计在人类基因组中有 2000000 个三聚和四聚的 STR 存在，每 15kb 就会出现 1 个（Edwards 等(1991)，“用三聚和四聚的串联重复序列进行 DNA 分

型和遗传作图”，美国人类遗传学 49：746-756；Beckman, J.S., Weber, J.L.(1992)，“人和大鼠微卫星的调查”，基因组 12：627-631)。由 Edwards 等(1991)研究的 STR 基因座有近一半是多态的，它们提供了遗传标记的丰富来源。

在一特定基因座的短串联重复单元的数目变化导致在该基因座的 DNA 的长度在各等位基因之间及在个体之间有变化，这种长度多态性与可变数目串联重复(VNTR)基因座(Nakamura,Y.等(1987)，“用于人类基因作图的可变数目串联重复(VNTR)标记”，科学 235：1616-1622)和小卫星基因座(Jeffreys,A.J.等，(1985)“人 DNA 中的高度可变“小卫星区”区”，自然 314：67-73)有关，这两种基因座均含有比 STR 基因座长得多的重复单元。这种长度多态性也与微卫星基因座的二核苷酸重复形式类似(Litt,M.,Luty,J.A.(1989),“通过体外扩增心肌激动素基因内的二核苷酸重复揭示的高度可变的微卫星体”，美国人类遗传学 44：397-401，Tautz,D.等(1986)，“DNA 的密码简易性是遗传变异的主要来源”，自然 322：652-656，Weber,J.L.,May,P.E.(1989)，“可用聚合酶链反应分型的一大类人 DNA 多态性”，美国人类遗传学 44：388-396；Beckman and Weber (1992))，该形式的微卫星基因应具有比 STR 基因座短的重复单元。

多态 STR 基因座是用于人类鉴别，父系测试和遗传作图特别有用的标记。通过采用在串联重复序列侧翼区鉴别的特异引物序列进行聚合酶链反应(PCR)可以扩增 STR 基因座。

这些基因座的等位基因是由在扩增区域内所含的重复序列的拷贝数而区分，并在电泳分离后由任何合适的检测方法如放射性、荧光、银染或颜色而彼此区分。

为使劳动力、材料和分析时间最小化，希望的是同时分析多个基因座和/或较多的样品，达到这一目的的一个途径是在一个单一反应中同时扩增多个基因座。文献中已广泛描述了这种“多重”扩增。

多重扩增系列已被广泛开发用于分析与人类遗传疾病有关的基因，所述疾病如 Duchenne 肌营养不良症(Chamberlain,J.S.等(1989)，“通过多重 DNA 扩增对 Duchenne 肌营养不良症基因座进行缺失扫描”，核酸研究 16：11141-11156；Chamberlain,J.S.等(1989)，“用于诊断 Duchenne 肌营养不良症的多重 PCR”，PCR 方案，方法和应用指南(编辑 Gelfand，D.H.等)第 272-281 页，学术出版社，San Diego, CA;Beggs,A.H.等(1990)“由 PCR 检测 98%DMD/BMD 基因缺失”，人类遗传学 86：45-48；Clemens,P.R.等(1991)，“用二核苷酸重复多态性对 Duchenne 和 Becker 肌营养不良症家族进行携带者检测和产前诊断”，美国人类遗传学杂志 49：951-960；Schwartz,J.S.等(1992)，“Duchenne/Becker’s 肌营养不良症的荧光多重连锁分析和携带者检测”，美国人类遗传学杂志 51：721-729；Covone,A.E.等(1992)，“通过三重 PCR 筛选 Duchenne 和 Becker 肌营养不良症患者以检测营养不良蛋白基因的 30 个外显子中的缺失”，美国人类遗传学杂志 51：675-677)，Lesch-Nyhan 综合征(Gibbs,R.A.等(1990)，“Lesch-Nyhan 家族的次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因的多重 DNA 缺失检测和外显子测序”，基因组 7：235-244)，囊性纤维化(Estivill,X.等(1991)，“由突变和微卫星体等位基因的多重 PCR 产前诊断囊性纤维化”，柳叶刀 338：458；Fortina,P.等(1992)“由多重聚合酶链反应对囊性纤维化跨膜传导调节物基因中的最常见突变进行非放射性检测”，人类遗传学 90：375-378；Ferrie,R.M.等(1992)，“用于检测 CFTR 基因中的常见突变的 ARMS 试验的开发、多重化及应用”，美国人类遗传学杂志 51：251-262；Morral,N.和 Estivill,X.(1992)，“CFTR 基因内的三个微卫星体的多重 PCR 扩增”，基因组 51：1362－1364)，以及成视网膜细胞瘤（Lohmann，D 等（1992)，“由多重 PCR 和高分辨凝胶电泳检测成视网膜细胞瘤中的小 RB1 基因缺失”，人类遗传学 89：49-53)。多态微卫星体标记的多重扩增(Clemens 等(1991)；Schwartz 等(1992)；

Huang,T.H.-M.等(1992)，“用多重聚合酶链反应对 X 染色体上的 4 个二核苷酸重复基因座 DXS435，DXS45，DXS454，DXS424 进行遗传作图”，基因组 13：375-385)，甚至是 ST12 标记的多重扩增(Edwards,A 等(1992)，“4 个人群组中的 5 个三聚和四聚串联重复基因座的遗传变异”，基因组 12：241-253；Kimpton,C.P.等(1993)，“采用短串联重复基因座的多重扩增的自动 DNA 归类”，PCR 方法和应用 3：13-22；Hammond,H.A.等(1994)，“13 个 STR 基因应用于个人识别应用的评价”，美国人类遗传学杂志 55：175-189；Schumm,J.W.等(1994)，“用于分析多态 STR 基因座的非同位素多重扩增反应的开发”，第四届人类鉴定国际研讨会 1993，第 177-187 页；Oldroyd,N.J.等(1995)，“适用于人类个体鉴定的高分辨性十重短串联重复聚合酶链反应系统”，电泳 16：334-337)已有描述。

这些扩增产物通常由本领域技术人员公知的几种电泳方法中的一种而分离，几种熟知的检测扩增产物的方法也已有描述。尽管在某些情况下采用扩增片段的溴乙锭染色或银染，但在其它情况下优选使用仅标记扩增材料的两条链中的一条链的方法，后者的例子包括在扩增基因座之前放射标记或荧光标记两个引物中的一个。一种更复杂的检测方法是利用不同的荧光标记以检测代表不同基因座但在电泳后位于同一空间的扩增材料。使用滤膜或其它区分性检测剂区分不同基因座的产物，使得在一个时间显示一种荧光标记。

请参照国际公开 WO93/18177 和 WO93/18178(Fortina 等)，其涉及使用等位基因特异性多重聚合酶链反应系统分别诊断如囊性纤维化和β－地中海贫血等疾病的方法和试剂盒，根据 Fortina 等，多重 PCR 也已被用于同时扩增多个靶序列，用琼脂糖凝胶的两条泳道进行突变等位基因扫描。

Ballabio,A.等(1991)，“囊性纤维化缺失的 PCR 测试”，自然 343：220，公开了使用两个不同染料标记的荧光引物检测 F508 囊性纤维

化突变的单管多重等位基因特异性 PCR 测试。

尽管对于特异的基因座有多重扩增程序，但是仍需要用于检测其它类型的基因座如特异 STR 基因座的等位基因的多重扩增程序。还需要鉴别能多重扩增这种基因座的引物。

发明简述

因此，本发明的一个目的在于提供使用 PCR 或其它扩增系统同时扩增多个独立的多态短串联重复(STR)基因座的方法和材料，以在一个反应中确定在多重系统中所含的每个基因座的等位基因。本文所公开的特异 STR 基因座的多重分析在现有技术中未见描述。本文下述公开的许多引物的序列也未见描述，所有这些引物对于这种 STR 基因座的多重扩增均是有用的。

本发明的另一个目的在于提供特异于包含特异基因座的多重扩增的方法、试剂盒和引物。

这些和其它目的通过本发明而实现，本发明涉及用于同时分析或确定存在于每个多重系统中的每个基因座的等位基因的方法和材料。一般来说，本发明的方法包括下述步骤：(a)获得至少一个待分析的 DNA 样品，其中该 DNA 样品具有至少两个可一起扩增的基因座；(b)扩增 DNA 样品中的 STR 序列；和(c)以揭示所采用的系统的多态性的方式检测扩增出的材料。

更具体地，本发明的方法是一种用于同时确定存在于来自或多个 DNA 样品的至少 3 个串联重复基因座中的等位基因的方法，所述方法包括下述步骤：

(a)获得至少一个待分析的 DNA 样品，其中该 DNA 样品具有可一起扩增的一套至少 3 个基因座，其中该套基因座选自特异一组或本文公开的基因座套；

(b)在一多重扩增反应中共扩增该套基因座，其中反应产物是来自该套共扩增的基因座中的每一个基因座的扩增的等位基因的混合

物；以及

(c)评价混合物中的扩增的等位基因以确定在 DNA 样品内该套被分析的每一个基因座上存在的等位基因。

在本发明的一个实施方案中，3 个 STR 基因座被一起扩增，并且该套 3 个共扩增的基因座选自如下一组：

D3S1539, D19S253, D13S317;
D10S1239, D9S930, D20S481;
D10S1239, D4S2368, D20S481;
D10S1239, D9S930, D4S2368;
D16S539, D7S820, D13S317; 和
D10S1239, D9S930, D13S317.

在本发明方法的一个更优选的方案中，DNA 样品具有至少 4 个可一起扩增的 STR 基因座，并且该套共扩增的基因座选自如下一组基因座：

D3S1539, D4S2368, D5S818, D7S820, D9S930, D10S1239, D13S317, D14S118, D14S548, D14S562, D16S490, D16S539, D16S753, D17S1298, D17S1299, D19S253, D20S481, D22S683, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUMFESFPS, HUMF13A01, HUMBFXIII, HUMLIPOL, HUMvWFA31.

可一起扩增的该套至少 4 个 STR 基因座更优选地是选自如下一组 4 个基因座套的一套基因座：

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;
D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;
D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;
D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;
D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;
D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481; 和

D16S539, D7S820, D13S317, HUMvWFA31.

更优选地，一起扩增的该套 STR 基因座是一套 6 个基因座，选自如下基因座套：

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX; 和

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS.

还更优选地，一起扩增的该套 STR 基因座是一套 7 个基因座，选自如下基因座套：

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01; 和

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII.

还更优选地，一起扩增的该套 STR 基因座是一套 8 个基因座，选自如下基因座套：

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUMvWFA31; 和

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

本发明方法的多重扩增反应步骤优选地用位于在反应中共扩增

的该套基因座的每个基因座两侧的引物对进行。更优选地，多重扩增反应所用的引物对的选择是能从每个基因座产生当用凝胶电泳分离时不与共扩增的其它基因座的等位基因重叠的等位基因。更优选地，多重扩增反应中所用的每个引物对中的一个引物的序列选自如下引物序列：

SEQ ID NO：1 和 SEQ ID NO：2，当该套基因座中的一个基因座是 D7S820 时；

SEQ ID NO：3 和 SEQ ID NO：4，当该套基因座中的一个基因座是 D13S317 时；

SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：6，当该套基因座中的一个基因座是 D5S818 时；

SEQ ID NO：7，SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：49，当该套基因座中的一个基因座是 D3S1539 时；

SEQ ID NO：9，SEQ ID NO：10，当该套基因座中的一个基因座是 D17S1298 时；

SEQ ID NO：11，SEQ ID NO：12，SEQ ID NO：52，SEQ ID NO：53，当该套基因座中的一个基因座是 D20S481 时；

SEQ ID NO：13，SEQ ID NO：14，SEQ ID NO：55，SEQ ID NO：61，当该套基因座中的一个基因座是 D9S930 时；

SEQ ID NO：15，SEQ ID NO：16，SEQ ID NO：54，当该套基因座中的一个基因座是 D10S1239 时；

SEQ ID NO：17，SEQ ID NO：18，当该套基因座中的一个基因座是 D14S118 时；

SEQ ID NO：19，SEQ ID NO：20，当该套基因座中的一个基因座是 D14S562 时；

SEQ ID NO：21，SEQ ID NO：22，当该套基因座中的一个基因座是 D14S548 时；

SEQ ID NO：23，SEQ ID NO：24，当该套基因座中的一个基因座是 D16S490 时；

SEQ ID NO：25，SEQ ID NO：26，当该套基因座中的一个基因座是 D16S753 时；

SEQ ID NO：27，SEQ ID NO：28，当该套基因座中的一个基因座是 D17S1299 时；

SEQ ID NO：29，SEQ ID NO：30，SEQ ID NO：58，当该套基因座中的一个基因座是 D16S539 时；

SEQ ID NO：31，SEQ ID NO：32，当该套基因座中的一个基因座是 D22S683 时；

SEQ ID NO：33，SEQ ID NO：34，当该套基因座中的一个基因座是 HUMCSF1PO 时；

SEQ ID NO：35，SEQ ID NO：36，当该套基因座中的一个基因座是 HUMTPOX 时；

SEQ ID NO：37，SEQ ID NO：38，当该套基因座中的一个基因座是 HUMTHO1 时；

SEQ ID NO：39，SEQ ID NO：40，SEQ ID NO：59，SEQ ID NO：60，当该套基因座中的一个基因座是 HUMvWFA31 时；

SEQ ID NO：41，SEQ ID NO：42，当该套基因座中的一个基因座是 HUMF13A01 时；

SEQ ID NO：43，SEQ ID NO：44，当该套基因座中的一个基因座是 HUMFESFPS 时；

SEQ ID NO：45，SEQ ID NO：46，当该套基因座中的一个基因座是 HUMBFXIII 时；

SEQ ID NO：47，SEQ ID NO：48，当该套基因座中的一个基因座是 HUMLIPOL 时；

SEQ ID NO：50，SEQ ID NO：51，当该套基因座中的一个基因

座是 D19S253 时；和

SEQ ID NO：56，SEQ ID NO：57，当该套基因座中的一个基因座是 D4S2368 时。

在本发明方法中，扩增的等位基因优选地通过将其与分子量大小标准相比较而评价，其中分子量大小标准选自 DNA 标记物和基因座特异性等位基因梯。等位基因的评价优选地用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等位基因，由此形成分离的等位基因的聚丙烯酰胺凝胶而进行。聚丙烯酰胺凝胶中的分离的等位基因优选地通过用合适的技术如银染，更优选地用荧光分析而显色等位基因来确定。

荧光分析优选地通过在用于反应中之前用荧光标记物标记多重扩增反应中所用的每个引物对中的一个引物来进行。用于标记每个这种引物的荧光标记物优选地是荧光素标记物或四甲基罗丹明标记物。最优选地，使用至少两种不同的标记物标记用于多重扩增反应中的不同的引物。

使用本发明方法的待分析的至少一个 DNA 样品优选地从人组织中分离，优选下述组织：血液、精液、阴道细胞、头发、唾液、尿液、骨骼、口腔样品、含有胎盘细胞或胚胎细胞的羊膜液，以及上述组织的混合物。

在另一个实施方案中，本发明是用于同时分析至少 3 个基因座中的 STR 序列的试剂盒，该试剂盒包括一个容器，容器中具有用于扩增一套至少 3 个短串联重复基因座的寡核苷酸引物对，其中该套基因座选自如下：

D3S1539, D19S253, D13S317;

D10S1239, D9S930, D20S481;

D10S1239, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368;

D16S539, D7S820, D13S317;

D10S1239, D9S930, D13S317;

D3S1539, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1298, D7S820, D13S317, D5S818;

D20S481, D7S820, D13S317, D5S818;

D9S930, D7S820, D13S317, D5S818;

D10S1239, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S118, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S562, D7S820, D13S317, D5S818;

D14S548, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S490, D7S820, D13S317, D5S818;

D17S1299, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818;

D22S683, D7S820, D13S317, D5S818;

D16S753, D7S820, D13S317, D5S818;

D3S1539, D19S253, D13S317, D20S481;

D3S1539, D19S253, D4S2368, D20S481;

D10S1239, D9S930, D4S2368, D20S481;

D16S539, D7S820, D13S317, HUMvWFA31;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII;

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMCSF1PO, HUMTPOX, HUMTH01, HUMvWFA31; 和

D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, HUMF13A01, HUMFESFPS, HUMBFXIII, HUMLIPOL.

试剂盒中包括的每个引物对中的至少一个引物优选地具有选自上述描述本发明方法时所列的一组序列中的一个序列。

在第三个实施方案中，本发明是用于扩增人类 DNA 的特异 STR 基因座的引物序列和引物对。本文以下描述了使用本发明的引物和引物对对人类 DNA 进行多重分析。本发明的引物适合用于本发明的方法中，其中根据在方法的评价步骤中确定扩增的等位基因的方式，它们可以以标记的或未标记的形式使用。

在上述简要描述的各种实施方案中，本发明提供了使用特定组合的基因座和特定条件检测和分析多态性遗传标记的高效方法和材料。通过选择用于评价步骤的合适的检测技术，本发明的材料和方法可以在仅具有电力供应和聚丙烯酰胺凝胶电泳标准装置的实验室中应用，也可在具有最新的用于荧光凝胶扫描设备的实验室中应用，这些最新设备例如 FluorImager™ 575(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)或日立 FMBIO™(San Bruno，CA)荧光扫描仪或 ABI373 和 ABI Prism™ 377 DNA 测序仪(Applied Biosystems Division,Perkin Elmer,Foster City,CA)。因此，本发明的方法适应于各种用途和实验室。

本发明描述的途径在分析多重体系中所含的基因座时节省时间、劳力和材料。本发明的方法使得能用一个单一扩增反应在一个试管中一起扩增 3 个或更多，甚至 8 个或更多个基因座，而不必在不同的试管中单独扩增每个基因座。

本发明在法医学分析、亲子鉴定、骨髓移植监视、连锁作图及检测遗传疾病和癌症等领域有特殊用途。通过能同时扩增和分析 3 个或更多个基因座，本发明的材料和方法明显提高了将从两个不同个体的血液或其它组织分离的 DNA 进行匹配的肯定性。在法医学应用中急需精确区分不同个体的少量组织，在该应用中许多有罪宣判(或无罪宣判)取决于 DNA 分型分析，包括 STR 基因座分析。

科学家，特别是法医学科学家很久以来就意识到需要分析 DNA 的多个多态性基因座以保证两个组织样品之间的匹配是统计学明显的(Presley,L.A.等(1993)，“由 FBI 实验室进行的聚合酶链反应(PCR)，HLA DQα 分型”，第三届人类鉴定国际研讨会 1992，第 245-269 页；Bever,R.A.等(1992)，“由 Hae III RFLP 分析鉴定 5 个 VNTR 基因座，用于亲子鉴定测试”，第二届人类鉴定国际研讨会 1991，第 103-128 页)。然而，直至本发明完成之前，仅有少数方法能用于在一个单一反应中同时分析 3 个或更多个 STR 基因座。为理解这种多重能力的重要性，有必要了解一些 DNA 分型分析的数学。

举例来说，假定每个 STR 的基因型(即两个等位基因模式)几率为十分之一，也就是说，假定两个随机选择的个体具有单一 STR 的匹配类型的几率是 1/10。然而如果分析两个不同 STR 基因座，则两个系统随机匹配的几率为 1/100。如果分析 3 个 STR 基因座，则 3 个系统中每一个的随机匹配的几率变为 1/1000，以此类推。结果是，很容易看到增加所分析的 STR 基因座数目至超过三个基因座以上能明显降低一般人群中随机匹配的可能性，从而通过将犯罪嫌疑人的类型与犯罪现场证据相比较就可增加精确鉴别(或排除)该人的几率。使用类似的推导可以得出如下结论，本发明的方法也可增加精确鉴定亲子案件中受怀疑的父亲，骨髓组织的正确匹配，来自连锁作图研究的显著结果，以及检测遗传疾病和癌症的可能性。

本发明的其它目的、特征和优点将根据以下的详细描述和附图而变得清楚。

附图简述

图 1 是一激光打印的图象，显示了实施例 1 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D3S1539，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 2 是一激光打印的图象，显示了实施例 2 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 3 是一激光打印的图象，显示了实施例 3 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 4 是一激光打印的图象，显示了实施例 4 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 5 是一激光打印的图象，显示了实施例 5 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 6 是一激光打印的图象，显示了实施例 6 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D9S930，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 7 是一激光打印的图象，显示了实施例 7 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 8 是一激光打印的图象，显示了实施例 8 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检

测图。

图 9 是一激光打印的图象，显示了实施例 9 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D14S118，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 10 是一激光打印的图象，显示了实施例 10 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D14S562，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 11 是一激光打印的图象，显示了实施例 11 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D14S548，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 12 是一激光打印的图象，显示了实施例 12 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D16S490，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 13 是一激光打印的图象，显示了实施例 13 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D16S753，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 14 是一激光打印的图象，显示了实施例 14 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D17S1299，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 15 是一激光打印的图象，显示了实施例 15 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座

D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 16 是一激光打印的图象，显示了实施例 16 中用 FluoImager™ 荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D22S683，D7S820，D13S317 和 D5S818 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 17 是一激光打印的图象，显示了实施例 17 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”）和 HUMTPOX（“TPOX”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 18 是一激光打印的图象，显示了实施例 18 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”）和 HUMTH01（“TH01”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 19 是一激光打印的图象，显示了实施例 19 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”），HUMTH01（“TH01”）和 HUMvWFA31（“vWA”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 20 是一激光打印的图象，显示了实施例 20 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”）和 HUMFESFPS（“FESFPS”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 21 是一激光打印的图象，显示了实施例 21 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”），

HUMFESFPS（“FESFPS”）和 HUMBFXIII（“F13B”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 22 是一激光打印的图象，显示了实施例 22 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”），HUMFESFPS（“FESFPS”），HUMBFXIII（“F13B”）和 HUMLIPOL（“LPL”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 23 是一激光打印的图象，显示了实施例 23 中用 FMBIO™荧光扫描仪™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测的基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”），HUMTH01（“TH01”）和 HUMvWFA31（“vWA”）的同时扩增产物的荧光检测图。

图 24 是一激光打印的图象，显示了实施例 24 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 25 是一激光打印的图象，显示了实施例 25 中用 FluoImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测的基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 的同时扩增产物的荧光检测图。

图 26 是一幅显示了实施例 26 中 3 个基因座 D16S539，D7S820 和 D13S317 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 27 是一幅显示了实施例 27 中 4 个基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 HUMvWFA31（“vWA”）的同时扩增产物的银染检测照片。

图 28 是一幅显示了实施例 28 中 3 个基因座 D10S1239，D9S930 和 D13S317 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 29 是一幅显示了实施例 29 中 3 个基因座 D10S1239，D9S930 和 D4S2368 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 30 是一幅显示了实施例 30 中 4 个基因座 D10S1239，D9S930 和 D4S2368 和 D20S481 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 31 是一幅显示了实施例 31 中 3 个基因座 D3S1539，D19S253 和 D13S317 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 32 是一幅显示了实施例 32 中 4 个基因座 D3S1539，D19S253，D4S2368 和 D20S481 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 33 是一幅显示了实施例 33 中 4 个基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 34 是一幅显示了实施例 34 中 3 个基因座 D10S1239，D9S930 和 D20S481 的同时扩增产物的银染检测照片。

图 35 是一幅显示了实施例 35 中 3 个基因座 D10S1239，D4S2368 和 D20S481 的同时扩增产物的银染检测照片。

发明的详细描述

A.定义

以下定义有助于清楚地理解下述术语的范围和细节：

等位基因梯：由从基因座扩增的等位基因组成的标准分子量大小标记。

等位基因：与 DNA 区段相关的基因变异，即占据同一基因座的两或多种不同形式的 DNA 序列中的一种。

生物化学命名：本文使用标准的生物化学命名，其中核苷酸碱基记作腺嘌呤(A)；胸腺嘧啶(T)；鸟嘌呤(G)；和胞嘧啶(C)。相应的核苷酸例如是脱氧鸟苷-5’-三磷酸(dGTP)。

DNA 多态性：在一种 DNA 序列中有两或多种不同核苷酸序列共存在同一种间杂交群体中的状态。

基因座：染色体上的特定位置，基因座的等位基因位于同源染

色体的相同位点上。

基因座特异性引物：在扩增方法所用的条件下，至少对于所述基因座的一个等位基因而言，与该基因座的一部分或其互补链特异杂交但不与其它 DNA 序列有效杂交的一种引物。

聚合酶链反应(PCR)：用变性、与引物退火及 DNA 聚合酶延伸的多个循环将靶 DNA 序列的拷贝数扩增约 10^6 倍或更多倍的技术。用于扩增核酸的聚合酶链反应方法由美国专利 4，683，195 和 4，683，202 覆盖，两篇专利引入本文用于描述该方法。

多态性短串联重复基因座：是这样一种 STR 基因座，其中在基因组 DNA 的一特定区域中重复序列单元数(及序列净长度)由等位基因的不同而不同，由个体的不同而不同。

多态性信息含量(PIC)：在一个基因座存在的多态性的量的量度(Bostein 等，1980)。PIC 值从 0 至 1.0，值越高表示多态性程度越高。这一量度通常比其它常用的量度即杂合度显示出较小的值。对于高信息含量的标记(杂合度超过约 70%)，杂合度和 PIC 之间的差异很小。

一级反应：用纯化的人基因组 DNA 作为 PCR 模板的初始反应。

引物，两个单链寡核苷酸或 DNA 片段，其与基因座的对应链杂交从而引物的 3’末端位于最近端。

引物对：两个引物，包括引物 1，其与待扩增的 DNA 序列的一端的单链杂交，以及引物 2，其与待扩增的 DNA 序列的互补链的另一端杂交。

引物位点，引物与之杂交的靶 DNA 的区域。

二级反应：使用初级反应物的稀释液作为 PCR 模板利用相同或不同引物对进行的再扩增。

短串联重复基因座(STR 基因座)：含有长度为 3-7bp 的短的重复序列单元的人基因组区域。

B.多重反应成分的选择

本发明方法涉及选择一套合适的基因座、引物及扩增方案以从多个共扩增的基因座产生扩增的等位基因，这些扩增的等位基因或者大小互不重叠，或者大小重叠但以某种方式被标记而使它们相互能区分开。另外，本发明方法还涉及选择能使用一单扩增方案的短串联重复基因座。本文描述的基因座的特异组合是本申请特有的。基因座的组合可由上述两种原因的任一种而否决，或者由于结合考虑一或多个基同座不能产生合适的产物产率或在这一反应中产生不能代表真正的等位基因的片段而加以否决。

除了本文公开的那些组合外，可以通过反复试验基因座组合、通过选择引物对序列及通过调整引物浓度以达到所有包括的基因座均可被扩增的平衡而产生成功的组合。一旦公开了本发明的方法和材料，本领域熟练技术人员很容易想到各种选择本发明方法和试剂盒中所用的基因座、引物对及扩增技术的方法，所有这些方法均属于所附权利要求书的范围内。

在本发明方法实施中特别重要的是从在多重扩增反应步骤中一起扩增的各个基因座产生的扩增的等位基因的大小范围。为了便于用目前的技术分析，最优选的是能通过扩增小于 500 个碱基的片段检测的系统。在上述发明简述部分描述了基因座、引物和扩增技术的最优选组合。

引物选择不合适会产生若干不希望的结果如缺少扩增、在多个位点扩增、形成引物二聚体、来自不同基因座的引物序列的不希望的相互作用、从一个基因座产生与另一个基因座的等位基因重叠的等位基因、或者对于在多重体系中不相容的不同基因座需要不同的扩增条件或方案。本方法所用的引物的合成可使用本领域技术人员公知的任何寡核苷酸合成标准程序来进行。

C.使用 3 个基因座的多重体系开发利用多于 3 个基因座的多重体系

可用许多不同技术中的任一种选择待分析的一套 STR 基因座。

以下描述了一种优选的用于开发用于这种分析方法中的有用的基因座套的技术。一旦开发了含有 3 个基因座的多重体系，可以其为核心创建含有多于 3 个基因座的多重体系。创建了新的组合，包括开始的 3 个基因座。使用含有基因座 D7S820，D13S317 和 D5S818 的核心多重体系产生下述衍生的多重体系：D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818；HUMCSF1PO，HUMTPOX，D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818；HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01，D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818；以及 HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01，HUMvWFA31，D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818。

应理解的是基因座核心套可用于产生其它合适的 STR 基因座衍生套，以用于用本发明方法进行多重分析。无论用何种方法选择用本发明方法分析的基因座，选择用于多重分析的所有基因座均应具有下述特征：(1)它们应产生最小的损耗(例如在扩增步骤中由错误重复序列而导致的损耗)，(2)在多重扩增步骤中由使扩增的等位基因添加或缺失一个碱基所致的假象很少或没有，(3)由聚合酶进行的扩增反应的未成熟终止所致的假象很少或没有，以及(4)没有低于给定的真扩增的等位基因的较小分子量的“拖后”带，所述的“拖后”带来自连续的单碱基缺失。见例如 Schumm 等，“用于多态性 STR 基因座的分析的非同位素多重扩增套的开发”，第四届人类鉴定国际研讨会 1993，第 177-187 页(Promega 公司出版，1993)。

D.DNA 样品的制备

可使用与扩增单个基因座相容的任何 DNA 制备方法制备用于本发明方法中的人基因组 DNA 样品，有许多这类方法适用于制备用于本发明方法中的基因组 DNA 样品，包括但不限于 Patel,P.I.等(1984)，“人基因组中的 HPRT 基因和相关序列的组织”，体细胞分子遗传学 10：483-493，和 Gill,P.等(1985)，“DNA“指纹”的法医学应用”，自然 318：577-579 描述的 DNA 样品制备方法。

在用于本发明方法之前，可用任何 DNA 检测标准方法测定 DNA 浓度。然而，优选使用如 Brunk C.F.等，4(1979)，“分析细胞匀浆物中的纳克量的 DNA”，分析生物化学 92：497-500 所述的测量技术经荧光测定 DNA 浓度。DNA 浓度更优选通过比较 DNA 标准与人特异性探针的杂交量而测定，如 Waye 等(1979)，Waye,J.S.等(1991)，“法医学样本中的人基因组脱氧核糖核酸(DNA)的灵敏特异性定量：案例”，J.Forensic Sci.,36:1198-1203 所述。在扩增反应中使用太多的模板 DNA 会产生假象，它们以另外的条带显示，但不代表真正的等位基因。

E.DNA 的扩增

分离出人基因组 DNA 样品并如上述测定其浓度后，可在本方法的多重扩增步骤中共扩增靶基因座。可使用各种不同扩增方法扩增基因座，包括但不限于聚合酶链反应(PCR)(Saiki)P.K.等(1985)，“β一珠蛋白基因组序列的酶促扩增及限制位点分析以用于诊断镰刀细胞贫血症”，科学 230：1350-1354)，基于转录的扩增(Kwoh,D.Y.,Kwoh,T.J.(1990)，“在基于核酸的诊断途径中的靶扩增系统”，美国生物技术实验室，1990 年 10 月)以及链置换扩增(SDA)(Walker,G.T.等(1992)，“由限制酶－DNA 聚合酶系统进行的等温体外扩增”，Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.89：392-396)。优选地，使用特异于该套基因座中每个基因座的引物对和热循环条件经 PCR 扩增 DNA 样品。下述实施例中使用的引物序列的详情请见本说明书最后的序列表，这些序列中的一些是本发明的另外的实施方案。

下述实施例中给出了用于本发明方法中的针对每个最优选基因座组合的最优选扩增方案的详情。关于每个多重体系的特殊程序的附加细节也请见实施例。在实施例中使用的基因座特异性引物的序列包括的核苷酸数目在杂交所用条件下足以使之与待扩增的基因座的一个等位基因杂交并基本上不扩增其它基因座的等位基因，请参

见 Simons 的美国专利 5，192，659，该专利引入本文作参考，其更详细地描述了基因座特异性引物。

F.DNA 片段的分离和检测

从本发明的多重扩增步骤产生一套扩增的等位基因后，评价扩增的等位基因。本方法的评价步骤可用各种不同方式完成，以下描述最优选的方式。

优选使用电泳分离多重扩增反应的产物，更优选变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(例见：Sambrook,J.等(1989)，分子克隆实验手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，第 13.45-13.57 页)。实施例 1 中描述了本发明方法的评价步骤中使用的最优选的凝胶制备和电泳程序及条件。在变性聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 片段的分离是基于片段的大小。

扩增的等位基因在聚丙烯酰胺凝胶中分离后，可显色凝胶中的等位基因和任何其它 DNA(例如，DNA 标记或等位基因梯)并进行分析。凝胶中的 DNA 的显色可用任一种现有技术完成，包括银染或报道者如放射性同位素、荧光物、化学发光物及与可检测底物组合的酶。银染是优选的显色凝胶中的等位基因的方法(例见，Bassam,B.J.等(1991)，“聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 的快速而灵敏的银染”，分析生物化学 196：80-83)。更优选的方法是在多重反应中使用针对每个基因座的放射性标记的引物(例见，Hammond 等(1994)）或荧光标记的引物(例见，Schumm 等(1994))，之后分别用放射自显影或荧光检测剂检测标记的产物。上述三篇描述显色等位基因的现有技术的参考文献均引入本文。

DNA 样品中存在的等位基因优选通过与分子量标准如 DNA 标记或基因座特异性等位基因梯比较而确定，从而确定样品内每个基因座上存在的等位基因。用于评价含有 2 个或多个多态性 STR 基因座的多重扩增反应的最优选的分子量标记由针对被评价的每个基因座的等位基因梯的组合而构成。例见，Schumm 等，文献同上，第 178

页的关于等位基因梯及其构建方法的描述。

用于评价含有由使用针对每个基因座的荧光标记引物而产生的 2 个或多个多态性 STR 基因座的多重反应的优选的分子量标记由针对被评价的每个基因座的荧光标记的等位基因梯的组合而构成，见上述。

构建了针对各个基因座的等位基因梯后，可将它们混合并在上样扩增的样品的同时将它们上样进行凝胶电泳。每个等位基因梯与样品中的来自相应基因座的等位基因共迁移。

使用 Automatic Processor Compatible (APC)膜(STP 系统手册#TMD004,得自 Promega 公司，Madison,WI)或使用荧光检测仪器(STP 系统手册#TMD006,得自 Promega 公司，Madison,WI)可以产生数据的永久记录。

G.优选的检测技术：荧光检测

在本发明方法的一个最优选实施方案中，使用荧光检测法评价由多重扩增反应产生的混合物中的扩增的等位基因。以下简述了如何优选地实施该检测方法。

由于自动荧光成像的出现，可以实现更快的多重扩增产物的检测和分析。对于荧光分析，可以将一个荧光素化的引物包括在每个基因座的扩增反应中。下述实施例中描述了两种优选的荧光标记引物的应用，即荧光素标记的(FL-)和四甲基罗丹明标记的(TMR-)引物。用这种标记的引物产生的扩增片段的分离与用银染检测法相同的方式进行。得到的凝胶可用 Fluor Imager ™ 分析仪(商购自 Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)或 FMBIO™(商购自 Hitachi Corporation,San Bruno,CA)分析，两种仪器可在非常短的时间内例如 3-20 分钟扫描凝胶并记录数据。

总之，本发明方法最优选在评价步骤使用荧光检测来进行，在这一优选的检测方法中，多重扩增反应中所用的每对引物对中的一

个引物附着有一个荧光标记，因此由扩增反应产生的扩增的等位基因是荧光标记的。在本发明的这一最优选实施方案中，扩增的等位基因随后在聚丙烯酰胺凝胶上分离并用荧光成像分析仪显色分析分离的等位基因。

荧光检测要优于放射性标记的检测方法是因为它不需使用放射性物质，所有与使用这种物质相关的规章和安全问题也不存在。

荧光检测还优于其它非放射性检测方法如银染，是因为荧光检测方法通常比染色法产生较少的假象，较少的凝胶假象可能很大程度上归因于在荧光检测中仅有附着标记的 DNA 扩增片段被检测，而使用银染检测方法时，从多重扩增反应中产生的每个 DNA 扩增片段均被染色和检测。用银染染色的聚丙烯酰胺凝胶还有明显较高的背景，这是由于银染染料与凝胶本身的非特异性结合所致，从而降低了检测凝胶内的 DNA 条带的灵敏性。下述两套实施例中比较了银染和荧光检测方法。

H.试剂盒

本发明还涉及使用上述方法的试剂盒，基本的试剂盒包括一个具有一或多个针对每个基因座的基因座特异性引物的容器。也可任选地包括使用说明。

其它任选的试剂盒成分可包括针对每个特殊基因座的等位基因梯，足够量的用于扩增的酶，促进扩增的扩增缓冲液，用于制备凝胶电泳所用扩增材料的上样溶液，作为模板对照的人基因组 DNA，用于保证材料如预期那样在凝胶中迁移的分子量标记，以及指导用户和限制使用错误的方案和手册。试剂盒中各种试剂的量也可根据各种因素如方法的最优灵敏度而变化。用于手工应用的测试试剂盒或用于自动检测仪或分析仪的测试试剂盒也在本发明范围内。

实施例

下述实施例意在举例说明本发明的优点并帮助本领域普通技术

人员完成和使用本发明。实施例无意限制本发明的范围。

基因组 DNA 分离和定量基本上按 Puers,C.等(1993)所述进行，“使用基因座特异性等位基因梯进行的人群分析中多态性短串联重复基因座 HUMTH01[AATG]$_n$ 上的重复序列异源性的鉴定以及等位基因的重排”，Am.J.Hum.Genet.53:953-958。这些方法通常是本领域人员公知的并且是本发明的应用所优选的但不是必须的。

通过 0.4mm 厚含 7M 尿素 4%变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺与双丙烯酰胺之比为 19：1)电泳分离扩增的产物(Sambrook 等，(1989))，当涉及银染分析时凝胶与玻璃板化学交联(Kobayashi,Y.(1988),“浇铸薄测序凝胶的方法”，BRL Focus 10:73-74)。在涉及荧光分析时不采用这种交联。DNA 样品与 2.5μl 上样溶液(10mM NaOH，95%甲酰胺，0.05%溴酚蓝，0．05% 二甲苯青)混合，在 95℃变性 2 分钟，并在上样前冰上冷冻。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，用银染、荧光检测、放射性检测或上述检测方法组合检测扩增反应产物和 DNA 分子量标记对照。在某些实施例中，使用现有技术中描述的染色和检测标准方法经银染检测凝胶中的反应产物和分子量标记。(例见 Bassam 等，(1991))。通过 Automatic Processor Compatible 膜(APC 膜，Promega 公司，货号 DQ4411)曝光而得到染色凝胶的永久图像。在其它实施例中，使用现有技术中描述的方法(Schumm 等，(1994))经荧光扫描进行检测。

下述每个实施例是本发明方法的使用例子，在某些情况下，是使用本发明一或多个引物的例子以同时确定在来自一或多个 DNA 样品的至少 3 个短串联重复基因座中存在的等位基因。表 1 和 2 总结了在下述每个实施例中描述的多重扩增反应中共扩增的基因座套，这两个表还指出了每个这种多重反应中所使用的用于扩增每个这种基因座的引物对。表 1 列出了用荧光扫描检测来自所描述的多重反应的扩增的等位基因的所有实施例，而表 2 列出了用银染检测扩增

的等位基因的实施例。

表 1 所列的每个引物对的一个引物在用于多重扩增反应之前用荧光标记。在某些情况下，使用不同的标记物标记针对不同基因座的引物，从而使用不同引物产生的等位基因可以用下述实施例中所用的荧光扫描仪扫描区分开。在下述实施例中使用了两种不同的荧光标记物，下表 1 中“FL”是指荧光标记的，“TMR”是指四甲基罗丹明标记的。表 1 还指出在每个实施例中用于多重扩增反应的每个引物对的哪个引物是如此标记的（例如，“FL－2”是指 SEQ ID NO：2 的引物在用于多重扩增反应之前用荧光素在其 5’末端标记）。

下述实施例中也使用了相同的 FL 和 TMR 缩写。然而其中标记物的缩写置于所述扩增反应使用的标记引物的 SEQ ID NO 之前（例如，“FL－SEQ ID NO：2”而非“FL－2”）。

在下述四对实施例（实施例 2 和 3，4 和 5，7 和 8，19 和 23）中，使用相同的引物套、与所分析的每个 STR 基因座的每个引物对中的一个引物共价附着的相同荧光标记物分析同一套基因座。但是在每个实施例中标记不同的引物套。本文包含这些实施例对是为了证明不管在用于本发明方法的多重扩增反应之前引物对的哪个引物被标记，从同一套引物中均能得到相同的低背景及相同的等位基因鉴定结果。

表 1

实施例	扩增的基因座	引物对：air: SEQ ID NO:'s	所用荧光标记
1	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
2	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
3	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
4	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
5	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
6	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
7	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
8	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
9	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
10	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
11	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6

12	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
13	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
14	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
15	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
16	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	FL-2 FL-4 FL-6
17	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33
18	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1 PO	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34 35, 36	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33 TMR-36
19	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMCSF1 PO	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 33, 34 35, 36	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-33 TMR-36
20	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41

21	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A 01	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42 43, 44	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41 TMR-43
22	D7S820 D13S317 D5S818 D16S539 HUMF13A 01	1, 2 3, 4 5, 6 29, 30 41, 42 43, 44	FL-2 FL-4 FL-6 FL-30 TMR-41 TMR-43
23	D7S820 D13S317 D5S818	1, 2 3, 4 5, 6	TMR-2 TMR-4 TMR-6
24	D3S1539 D19S253 D13S317	7, 49 50, 51 3, 4	FL-49 FL-50 FL-4
25	D10S1239 D9S930 D4S2368	15, 54 55, 14 56, 57	FL-15 FL-14 FL-57

注意到在少数情况下，相同的基因座套和相同的引物对套出现于表 1 和表 2 中。在这种情况下，分别使用荧光检测和银染分析相同的等位基因套。本文实施例 24 和 33，实施例 25 和 30 提供了两个这种重复例子。这些实施例清楚表明用两种方法均可获得相同结果。

表 2:

实施例	扩增的基因座	引物对：SEQ ID NO:'s
26	D16S539 D7S820	29, 58 1, 2
27	D16S539 D7S820 D13S317	29, 30 1, 2 3, 4
28	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
29	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 61
30	D10S1239 D9S930 D4S2368	15, 54 55, 14 56, 57
31	D3S1539 D19S253	7, 49 50, 51
32	D3S1539 D19S253 D4S2368	7, 49 50, 51 56, 57
33	D3S1539 D19S253 D13S317	7, 49 50, 51 3, 4
34	D10S1239 D9S930	15, 54 55, 14
35	D10S1239 D4S2368	15, 54 56, 57

实施例 1 基因座 D3S1539，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D3S1539，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.25μM D3S1539 引物 1[SEQ ID NO:7]和 2[FL－SEQ ID NO:8]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.219μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 1，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D3S1539，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 2 基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM

$MgCl_2$和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.25μM D17S1298 引物 1[SEQ ID NO:9]和 2[FL－SEQ ID NO:10]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.219μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 2，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 3 基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

如实施例 2 所述扩增基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818，只是用 FL－SEQ ID NO:9 替换 SEQ ID NO:9，用 SEQ ID NO:10 替换 FL－SEQ ID NO:10。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 3，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D17S1298，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 4 基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.25μM D20S481 引物 1[SEQ ID NO:11]和 2[FL－SEQ ID NO:12]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.219μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 4，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 5 基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

如实施例 4 所述扩增基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818，只是用 FL－SEQ ID NO:11 替换 SEQ ID NO:11，用 SEQ ID NO:12 替换 FL－SEQ ID NO:12。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分

钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 5，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D20S481，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 6 基因座 D9S930，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D9S930，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.70μM D9S930 引物 1[SEQ ID NO:13]和 2[FL－SEQ ID NO:14]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 6，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D9S930，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 7 基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重

扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.75μM D10S1239 引物 1[SEQ ID NO:15]和 2[FL－SEQ ID NO:16]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 7，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 8 基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

如实施例 7 所述扩增基因座 D10S1239，D7S820，D13S317 和 D5S818，只是用 FL－SEQ ID NO:15 替换 SEQ ID NO:15，用 SEQ ID NO:16 替换 FL－SEQ ID NO:16。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分

钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 8，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D3S1539，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 9 基因座 D14S118，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D14S118，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D14S118 引物 1[SEQ ID NO:17]和 2[FL－SEQ ID NO:18]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 9，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D14S118，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 10 基因座 D14S562，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重

扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D14S562，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D14S562 引物 1[FL－SEQ ID NO:19]和 2[SEQ ID NO:20]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 10，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D14S562，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 11 基因座 D14S548，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D14S548，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin

Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D14S548 引物 1[SEQ ID NO:21]和 2[FL－SEQ ID NO:22]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 11，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D14S548，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 12 基因座 D16S490，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S490，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D16S490 引物 1[FL－SEQ ID NO:23]和 2[SEQ ID NO:24]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID

NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 12，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D16S490，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 13 基因座 D16S753，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S753，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D16S753 引物 1[SEQ ID NO:25]和 2[FL－SEQ ID NO:26]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 13，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有

针对基因座 D16S753，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 14 基因座 D17S1299，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D17S1299，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D17S1299 引物 1[SEQ ID NO:27]和 2[FL－SEQ ID NO:28]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 14，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D17S1299，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 15 基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座

D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.60μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[FL－SEQ ID NO:30]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.50μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™ 荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 15，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 16 基因座 D22S683，D7S820，D13S317 和 D5S818 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D22S683，D7S820，D13S317 和 D5S818 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90

℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.50μM D22S683 引物 1[SEQ ID NO:31]和 2[FL－SEQ ID NO:32]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.375μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 分钟而分离并用 FluorImager™荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 16，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D22S683，D7S820，D13S317 和 D5S818 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 17 基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO 和 HUMTPOX 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO 和 HUMTPOX 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.06U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 12 个扩增引物，包括各 0.65μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[FL－SEQ ID NO:30]，各 0.325μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.22μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.55μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]

和2[FL－SEQ ID NO:6]，各0.40μM HUMCSF1PO引物1[TMR-SEQ ID NO:33]和2[SEQ ID NO:34]，各0.40μM HUMTPOX引物1[SEQ ID NO:35]和2[TMR-SEQ ID NO:36]。

扩增产物在32cm凝胶上经40W变性聚丙烯酰胺凝胶电泳50分钟而分离并用FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图17，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在505nm和625nm扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道1－4含有针对基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”）和HUMTPOX（“TPOX”）同时共扩增的DNA样品。

实施例18 基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX和HUMTH01的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX和HUMTH01上的DNA模板。PCR扩增用5ng模板和0.07U Taq DNA聚合酶/μl在25μl 1×STR缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各200μM dATP, dCTP, dGTP和dTTP）中进行。用热循环仪480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2分钟，然后10个循环的94℃1分钟，60℃1分钟和70℃1.5分钟，之后20个循环的90℃1分钟，60℃1分钟，70℃1.5分钟，最后1个循环的60℃30分钟。

组合使用了14个扩增引物，包括各0.75μM D16S539引物1[SEQ ID NO:29]和2[FL－SEQ ID NO:30]，各0.40μM D7S820引物1[SEQ ID NO:1]和2[FL－SEQ ID NO:2]，各0.30μM D13S317引物1[SEQ ID NO:3]和2[FL－SEQ ID NO:4]，各0.60μM D5S818引物1[SEQ ID NO:5]和2[FL－SEQ ID NO:6]，各0.30μM HUMCSF1PO引物1[TMR-SEQ ID

NO:33]和 2[SEQ ID NO:34]，各 0.40μM HUMTPOX 引物 1[SEQ ID NO:35]和 2[TMR-SEQ ID NO:35]，各 0.40μM HUMTH01 引物 1[SEQ ID NO:37]和 2[TMR-SEQ ID NO:38]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 18，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在 505nm 和 625nm 扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道 1－5 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”） 和 HUMTH01（“TH01”）同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 19 基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01 和 HUMvWFA31 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01 和 HUMvWFA31 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.08U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 16 个扩增引物，包括各 0.75μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[FL－SEQ ID NO:30]，各 0.40μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.30μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.60μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]

和2[FL－SEQ ID NO:6]，各0.30μM HUMCSF1PO引物1[TMR-SEQ ID NO:33]和2[SEQ ID NO:34]，各0.40μM HUMTPOX引物1[SEQ ID NO:35]和2[TMR-SEQ ID NO:36]，各0.40μM HUMTH01引物1[SEQ ID NO:37]和2[TMR-SEQ ID NO:38]，各0.40μM HUMvWFA31引物1[SEQ ID NO:39]和2[TMR-SEQ ID NO:40]。

扩增产物在32cm凝胶上经40W变性聚丙烯酰胺凝胶电泳50分钟而分离并用FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图19，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在505nm和625nm扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道1－5含有针对基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”）HUMTH01（“TH01”）和HUMvWFA31（“vWF”）同时共扩增的DNA样品。

实施例20 基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01和HUMFESFPS的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01和HUMFESFPS上的DNA模板。PCR扩增用5ng模板和0.06U Taq DNA聚合酶/μl在25μl 1×STR缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各200μM dATP, dCTP, dGTP和dTTP）中进行。用热循环仪480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2分钟，然后10个循环的94℃1分钟，60℃1分钟和70℃1.5分钟，之后20个循环的90℃1分钟，60℃1分钟，70℃1.5分钟，最后1个循环的60℃30分钟。

组合使用了12个扩增引物，包括各0.75μM D16S539引物1[SEQ ID NO:29]和2[FL－SEQ ID NO:30]，各0.40μM D7S820引物1[SEQ ID

NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.30μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.60μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]，各 0.10μM HUMF13A01 引物 1[TMR-SEQ ID NO:41]和 2[SEQ ID NO:42]，各 1.0μM HUMFESFPS 引物 1[TMR-SEQ ID NO:43]和 2[SEQ ID NO:44]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 20，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在 505nm 和 625nm 扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道 1－5 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”）和 HUMFESFPS（“FESFPS”）同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 21 基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01，HUMFESFPS 和 HUMBFXIII 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01，HUMFESFPS 和 HUMBFXIII 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.07U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 14 个扩增引物，包括各 0.75μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[FL－SEQ ID NO:30]，各 0.40μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.30μM D13S317 引物 1[SEQ ID

NO:3]和2[FL－SEQ ID NO:4]，各0.60μM D5S818引物1[SEQ ID NO:5]和2[FL－SEQ ID NO:6]，各0.10μM HUMF13A01引物1[TMR-SEQ ID NO:41]和2[SEQ ID NO:42]，各1.0μM HUMFESFPS引物1[TMR-SEQ ID NO:43]和2[SEQ ID NO:44]，各0.50μM HUMBFXIII引物1[TMR-SEQ ID NO:45]和2[SEQ ID NO:46]。

扩增产物在32cm凝胶上经40W变性聚丙烯酰胺凝胶电泳50分钟而分离并用FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图21，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在505nm和625nm扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道1－5含有针对基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”），HUMFESFPS（“FESFPS”）和HUMBFXIII（“F13B”）同时共扩增的DNA样品。

实施例22 基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01，HUMFESFPS，HUMBFXIII和HUMLIPOL的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01，HUMFESFPS，HUMBFXIII和HUMLIPOL上的DNA模板。PCR扩增用5ng模板和0.08U Taq DNA聚合酶/μl在25μl 1×STR缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各200μM dATP, dCTP, dGTP和dTTP）中进行。用热循环仪480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2分钟，然后10个循环的94℃1分钟，60℃1分钟和70℃1.5分钟，之后20个循环的90℃1分钟，60℃1分钟，70℃1.5分钟，最后1个循环的60℃30分钟。

组合使用了16个扩增引物，各0.75μM D16S539引物1[SEQ ID NO:29]和2[FL－SEQ ID NO:30]，各0.40μM D7S820引物1[SEQ ID

NO:1]和 2[FL－SEQ ID NO:2]，各 0.30μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.60μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[FL－SEQ ID NO:6]，各 0.10μM HUMF13A01 引物 1[TMR-SEQ ID NO:41]和 2[SEQ ID NO:42]，各 1.0μM HUMFESFPS 引物 1[TMR-SEQ ID NO:43]和 2[SEQ ID NO:44]，各 0.50μM HUMBFXIII 引物 1[TMR-SEQ ID NO:45]和 2[SEQ ID NO:46]，各 0.20μM HUMLIPOL 引物 1[TMR-SEQ ID NO:47]和 2[SEQ ID NO:48]

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FMBIOFluorImager™（Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 22，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在 505nm 和 625nm 扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道 1－5 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMF13A01（“F13A01”），HUMFESFPS（“FESFPS”）和 HUMBFXIII（“F13B”）和 HUMLIPOL（“LPL”）同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 23 基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01 和 HUMvWFA31 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO，HUMTPOX，HUMTH01 和 HUMvWFA31 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.08U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200μlM dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90

℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 16 个扩增引物，包括各 0.75μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[TMR－SEQ ID NO:30]，各 0.40μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[TMR－SEQ ID NO:2]，各 0.30μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[TMR－SEQ ID NO:4]，各 0.60μM D5S818 引物 1[SEQ ID NO:5]和 2[TMR－SEQ ID NO:6]，各 0.40μM HUMCSF1PO 引物 1[FL-SEQ ID NO:33]和 2[SEQ ID NO:34]，各 0.50μM HUMTPOX 引物 1[SEQ ID NO:35]和 2[FL－SEQ ID NO:36]，各 0.20μM HUMTH01 引物 1[SEQ ID NO:37]和 2[FL－SEQ ID NO:38]，各 0.55μM HUMvWFA31 引物 1[SEQ ID NO:39]和 2[FL-SEQ ID NO:40]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FMBIOFluorImager™((Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 23，该图显示了每个基因座的扩增片段，同一凝胶分别在 505nm 和 625nm 扫描，分别揭示荧光素标记的和四甲基罗丹明标记的材料。泳道 1－3 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317，D5S818，HUMCSF1PO（“CSF1PO”），HUMTPOX（“TPOX”），HUMTH01（“TH01”）和 HUMvWFA31（“vWA”）同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 24 基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，

然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.75μM D3S1539 引物 1[SEQ ID NO:7]和 2[FL－SEQ ID NO:49]，各 0.75μM D19S253 引物 1[FL－SEQ ID NO:50]和 2[SEQ ID NO:51]，各 0.50μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[FL－SEQ ID NO:4]，各 0.50μM 和 D20S481 引物 1[SEQ ID NO:52]和 2[FL－SEQ ID NO:53]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FluorImager™(荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 24，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 25 基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 的多重扩增的荧光检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.30μM D10S1239 引物 1[FL－SEQ ID NO:15]和 2[SEQ ID NO:54]，各 0.40μM D9S930 引物 1[SEQ

ID NO:55]和 2[FL－SEQ ID NO:14]，各 0.50μM D4S2368 引物 1[SEQ ID NO:56]和 2[FL－SEQ ID NO:57]，各 0.50μM D20S48 引物 1[SEQ ID NO:52]和 2[FL－SEQ ID NO:53]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并用 FluorImager™(荧光扫描仪（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）检测荧光信号而显示产物。

参见图 25，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 26 基因座 D16S539，D7S820 和 D13S317 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820 和 D13S317 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5－20ng 模板和 0.03U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 6 个扩增引物，包括各 0.5μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[SEQ ID NO:58]，各 0.5μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[SEQ ID NO:2]，各 0.5μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[SEQ ID NO:4]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 26，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－4 含有针对基因座 D16S539，D7S820 和 D13S317 同时共扩增的 DNA 样品，

泳道 5 显示了进行相同程序但无 DNA 模板的样品，即阴性对照。

实施例 27 基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 HUMvWFA31 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 HUMvWFA31 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.3μM D16S539 引物 1[SEQ ID NO:29]和 2[SEQ ID NO:30]，各 0.3μM D7S820 引物 1[SEQ ID NO:1]和 2[SEQ ID NO:2]，各 0.5μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[SEQ ID NO:4]，各 0.5μM HUMvWFA31 引物 1[SEQ ID NO:59]和 2[SEQ ID NO:60]。

扩增产物在 32cm 凝胶上经 40W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 50 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 27，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1—3 含有针对基因座 D16S539，D7S820，D13S317 和 HUMvWFA31（“vWA”）同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 28 基因座 D10S1239，D9S930 和 D13S317 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D9S930 和 D13S317 上的 DNA 模板。PCR 扩增用未确定 ng 数模板和 0.03U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM

KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟。

组合使用了 6 个扩增引物，包括各 1.0μM D10S1239 引物 1[SEQ ID NO:15]和 2[SEQ ID NO:54]，各 0.3μM D9S930 引物 1[SEQ ID NO:55]和 2[SEQ ID NO:61]，各 0.5μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[SEQ ID NO:4]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 28，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－3 含有针对基因座 D10S1239，D9S930 和 D13S317 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 29 基因座 D10S1239，D9S930 和 D4S2368 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D9S930 和 D4S2368 上的 DNA 模板。PCR 扩增用未确定 ng 数模板和 0.03U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 6 个扩增引物，包括各 1.0μM D10S1239 引物 1[SEQ ID NO:15]和 2[SEQ ID NO:54]，各 0.3μM D9S930 引物 1[SEQ ID NO:55]和 2[SEQ ID NO:61]，各 0.15μM D4S2368 引物 1[SEQ ID NO:56]和

2[SEQ ID NO:57]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 29，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－6 含有针对基因座 D10S1239，D9S930 和 D4S2368 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 30 基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用未确定 ng 数模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃ 2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 1.0μM D10S1239 引物 1[SEQ ID NO:15]和 2[SEQ ID NO:54]，各 4.0μM D9S930 引物 1[SEQ ID NO:55]和 2[SEQ ID NO:14]，各 0.2μM D4S2368 引物 1[SEQ ID NO:56]和 2[SEQ ID NO:57]，各 0.2μM D20S481 引物 1[SEQ ID NO:52]和 2[SEQ ID NO:53]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 67 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 30，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－4 含有针对基因座 D10S1239，D9S930，D4S2368 和 D20S481 同时共扩增的 DNA 样品。

实施例 31 基因座 D3S1539，D19S253 和 D13S317 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D3S1539，D19S253 和 D13S317 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5.0ng 模板和 0.03U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟。

组合使用了 6 个扩增引物，包括各 1.0μM D3S1539 引物 1[SEQ ID NO:7]和 2[SEQ ID NO:49]，各 1.0μM D19S253 引物 1[SEQ ID NO:50]和 2[SEQ ID NO:51]，各 0.5μM D13S317 引物 1[SEQ ID NO:3]和 2[SEQ ID NO:4]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 65 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 31，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－4 含有针对基因座 D3S1539，D19S253 和 D13S317 同时共扩增的 DNA 样品，泳道 5 显示了进行相同程序但不含 DNA 模板的样品，即阴性对照。

实施例 32 基因座 D3S1539，D19S253，D4S2368 和 D20S481 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D3S1539，D19S253，D4S2368 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 5.0ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪

480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 1.0μM D3S1539 引物 1[SEQ ID NO:7]和 2[SEQ ID NO:49]，各 0.5μM D19S253 引物 1[SEQ ID NO:50]和 2[SEQ ID NO:51]，各 0.1μM D4S2368 引物 1[SEQ ID NO:56]和 2[SEQ ID NO:57]，各 0.1μM D20S481 引物 1[SEQ ID NO:52]和 2[SEQ ID NO:53]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 65 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 32，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－4 含有针对基因座 D3S1539，D19S253，D4S2368 和 D20S481 同时共扩增的 DNA 样品，泳道 5 显示了进行相同程序但不含 DNA 模板的样品，即阴性对照。

实施例 33 基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D3S1539，D19S253，D13S317 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 0.5－250ng 模板和 0.04U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 8 个扩增引物，包括各 0.5μM D3S1539 引物 1[SEQ ID NO:7]和 2[SEQ ID NO:49]，各 0.5μM D19S253 引物 1[SEQ ID NO:50]

和2[SEQ ID NO:51]，各0.5μM D13S317引物1[SEQ ID NO:3]和2[SEQ ID NO:4]，各0.2μM D20S481引物1[SEQ ID NO:52]和2[SEQ ID NO:53]。

扩增产物在40cm凝胶上经60W变性聚丙烯酰胺凝胶电泳68分钟而分离并根据Bassam等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图33，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道1－5含有针对基因座D3S1539，D19S253，D13S317和D20S481同时共扩增的DNA样品，泳道6显示了进行相同程序但不含DNA模板的样品，即阴性对照。

实施例34 基因座D10S1239，D9S930和D20S481的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座D10S1239，D9S930和D20S481上的DNA模板。PCR扩增用0.5－250ng模板和0.03U Taq DNA聚合酶/μl在25μl 1×STR缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$和各200(M dATP, dCTP, dGTP和dTTP）中进行。用热循环仪480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2分钟，然后10个循环的94℃1分钟，60℃1分钟和70℃1.5分钟，之后20个循环的90℃1分钟，60℃1分钟，70℃1.5分钟，最后1个循环的60℃30分钟。

组合使用了6个扩增引物，包括各1.0μM D10S1239引物1[SEQ ID NO:15]和2[SEQ ID NO:54]，各4.0μM D9S930引物1[SEQ ID NO:55]和2[SEQ ID NO:14]，各0.2μM D20S481引物1[SEQ ID NO:52]和2[SEQ ID NO:53]。

扩增产物在40cm凝胶上经60W变性聚丙烯酰胺凝胶电泳68分钟而分离并根据Bassam等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图34，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道1－5含有针对基因座D10S1239，D9S930和D20S481同时共扩增的DNA样

品，泳道 6 显示了进行相同程序但不含 DNA 模板的样品，即阴性对照。

实施例 35 基因座 D10S1239，D4S2368 和 D20S481 的多重扩增的银染检测

在本实施例中，在一个单个反应容器中同时扩增在各个基因座 D10S1239，D4S2368 和 D20S481 上的 DNA 模板。PCR 扩增用 0.5－250ng 模板和 0.03U Taq DNA 聚合酶/μl 在 25μl 1×STR 缓冲液（50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0, 25℃), 0.1%Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$ 和各 200(M dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP）中进行。用热循环仪 480（Perkin Elmer, Foster City, CA）进行下述扩增方案：96℃2 分钟，然后 10 个循环的 94℃1 分钟，60℃1 分钟和 70℃1.5 分钟，之后 20 个循环的 90℃1 分钟，60℃1 分钟，70℃1.5 分钟，最后 1 个循环的 60℃30 分钟。

组合使用了 6 个扩增引物，包括各 1.0μM D10S1239 引物 1[SEQ ID NO:15]和 2[SEQ ID NO:54]，各 0.2μM D4S2368 引物 1[SEQ ID NO:56]和 2[SEQ ID NO:57]，各 0.2μM D20S481 引物 1[SEQ ID NO:52]和 2[SEQ ID NO:53]。

扩增产物在 40cm 凝胶上经 60W 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 68 分钟而分离并根据 Bassam 等（1991）的方案经银染分析显示产物。

参见图 35，该图显示了每个基因座的扩增片段，泳道 1－5 含有针对基因座 D10S1239，D4S2368 和 D20S481 同时共扩增的 DNA 样品，泳道 6 显示了进行相同程序但不含 DNA 模板的样品，即阴性对照。

序列表

<110> 普罗梅加公司

<120> 短串联重复基因座的多重扩增

<130> HKSIT59654

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
gaacacttgt catagtttag aacg 24

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
ctgaggtatc aaaaactcag agg 23

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
acagaagtct gggatgtgga 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gcccaaaaag acagacagaa 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
gggtgatttt cctctttggt 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tgattccaat catagccaca 20

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
tctctttcca ttactctctc catagc 26

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
agtgctgttt tagcttccag ga 22

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
gtaggtcttt tggttgccag tatg 24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
tgtcagtaaa cctgtgacct gagt 24

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
aatggtgaga aatgggttat gagtgc 26

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
tttccggctt tgtgtcataa aacag 25

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
tggacaacag agtgagatgc 20

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14

gctatgggaa ttacaagcag gaa 23

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
ctttgaaatg gacccctagc taatgt 26

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
caccctgtcc ccagctatct g 21

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
cagcttgggc aacataggg 19

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
caaactcctg aggtcaaaca atcc 24

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
cttggagggt ggggtggcta a 21

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
cgaaattttg ttgccttgct ctgg 24

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
cctgggcaac agagtgagac t 21

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
acccagcttt aacagtttgt gctt 24

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
gggcggacac agaatgtaaa atc 23

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24
aaacccaaat agatgacagg caca 24

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 25
gcactccagg ctgaatgaca gaac 24

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 26
gcagtgccgc ctatttttgt gaat 24

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 27
accctgatga gatagcactt gagc 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
cactgtgtgg aggtgtagca gaga 24

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 29
gggggtctaa gagcttgtaa aaag 24

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
tgtgcatctg taagcatgta tctatc 26

<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
cgaaggttgc attgagccaa gat 23

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
tggtggaaat gcctcatgta gaaa 24

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
aacctgagtc tgccaaggac tagc 24

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
ttccacacac cactggccat cttc 24

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 35
actggcacag aacaggcact tagg 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 36
ggaggaactg ggaaccacac aggt 24

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 37
attcaaaggg tatctgggct ctgg 24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 38
gtgggctgaa aagctcccga ttat 24

<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 39
gaaagcccta gtggatgata agaataatc 29

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 40
ggacagatga taaatacata ggatggatgg 30

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 41
gaggttgcac tccagccttt gcaa 24

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 42
ttcctgaatc atcccagagc caca 24

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 43
gctgttaatt catgtaggga agg 23

<210> 44
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 44
gtagtcccag ctacttggct actc 24

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 45
tgaggtggtg tactaccata 20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 46
gatcatgcca ttgcactcta 20

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 47
ctgaccaagg atagtgggat atag 24

<210> 48
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 48
ggtaactgag cgagactgtg tct 23

<210> 49
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 49
ccacccttc agcaccag 18

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 50
atagacagac agacggactg 20

<210> 51
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 51
gggagtggag attacccct 19

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 52
aaagctctct gaagcaggtg t 21

<210> 53
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 53
cagattgcac tagaaagaga ggaa 24

<210> 54

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 54
caccctgtcc ccagctatct gga 23

<210> 55
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 55
agttgaatct tgagtctctc agagtca 27

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 56
tgtactcatt ttcccgcaat gatg 24

<210> 57
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 57
tcagaaagta gggtctgggc tctt 24

<210> 58
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 58
tgtgcatctg taagcatgta tctatcat 28

<210> 59
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 59
gaaagcccta gtggatgata agaataatca gt 32

<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 60
ggacagatga taaatacata ggatggatgg ata 33

<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 61
gctatgggaa ttacaagcag gaaac 25


12345
D3S1539
D7S820
D13S317
D5S818

图1

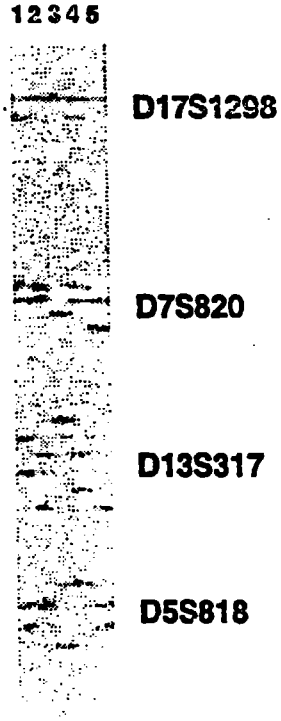

12345
D17S1298
D7S820
D13S317
D5S818

图2

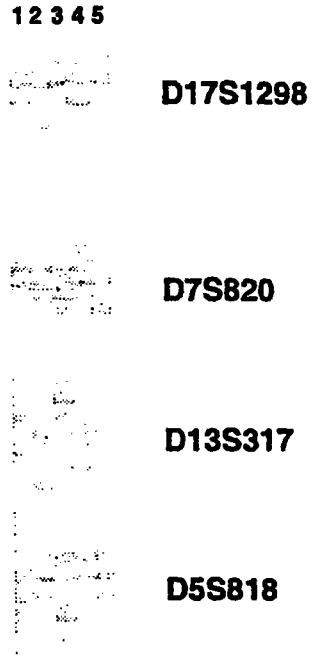

1 2 3 4 5
D17S1298
D7S820
D13S317
D5S818

图3


1 2 3 4 5
D20S481
D7S820
D13S317
D5S818

图4

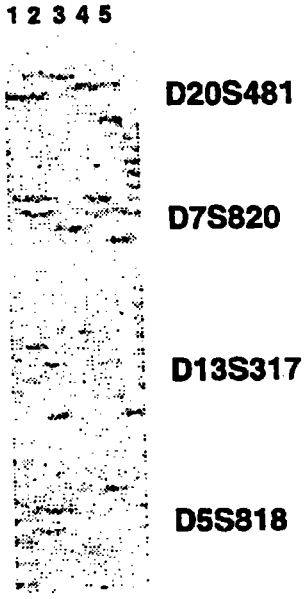

1 2 3 4 5
D20S481
D7S820
D13S317
D5S818

图5

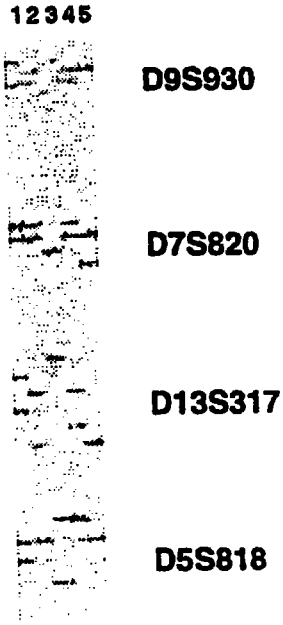

1 2 3 4 5
D9S930
D7S820
D13S317
D5S818

图6


1 2 3 4 5
D10S1239
D7S820
D13S317
D5S818

图7

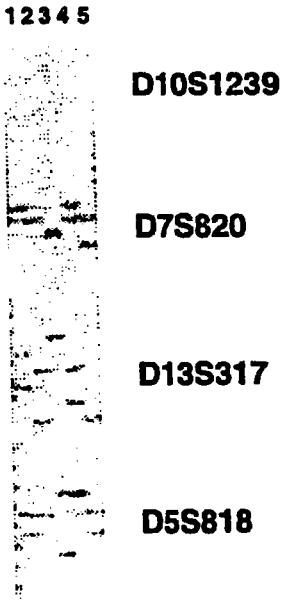

1 2 3 4 5
D10S1239
D7S820
D13S317
D5S818

图8

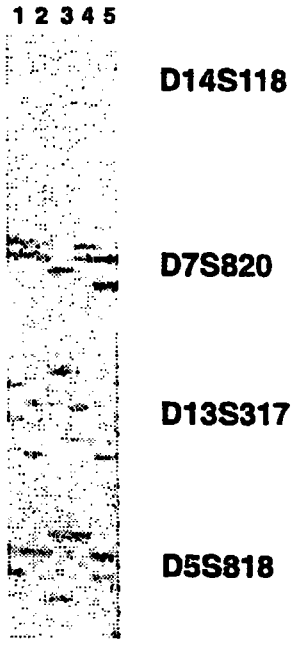

1 2 3 4 5
D14S118
D7S820
D13S317
D5S818

图9

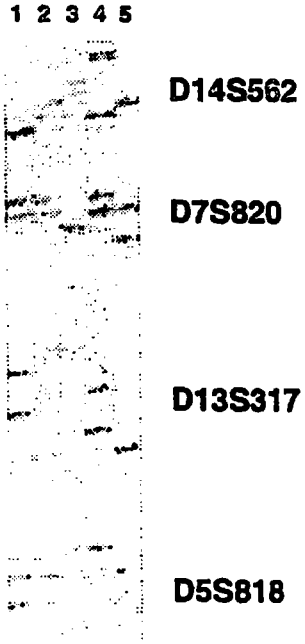

1 2 3 4 5
D14S562
D7S820
D13S317
D5S818

图10

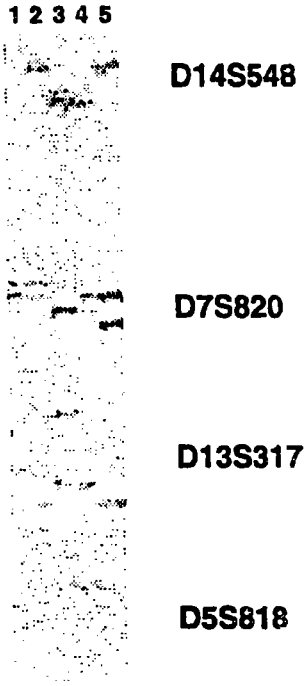

1 2 3 4 5
D14S548
D7S820
D13S317
D5S818

图11

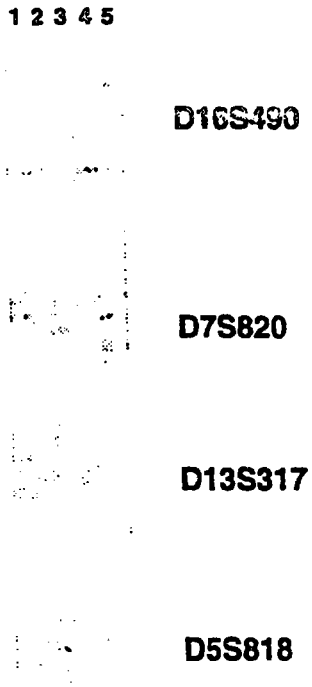

1 2 3 4 5
D16S490
D7S820
D13S317
D5S818

图12

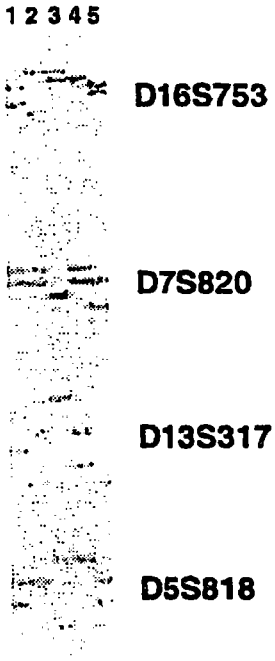

1 2 3 4 5
D16S753
D7S820
D13S317
D5S818

图13


1 2 3 4 5
D17S1299
D7S820
D13S317
D5S818

图14

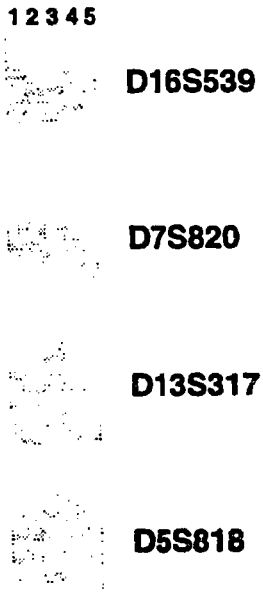

1 2 3 4 5
D16S539
D7S820
D13S317
D5S818

图15

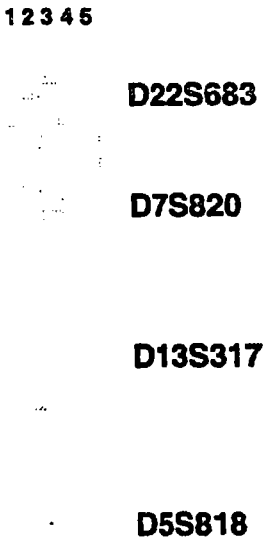

1 2 3 4 5
D22S683
D7S820
D13S317
D5S818

图16

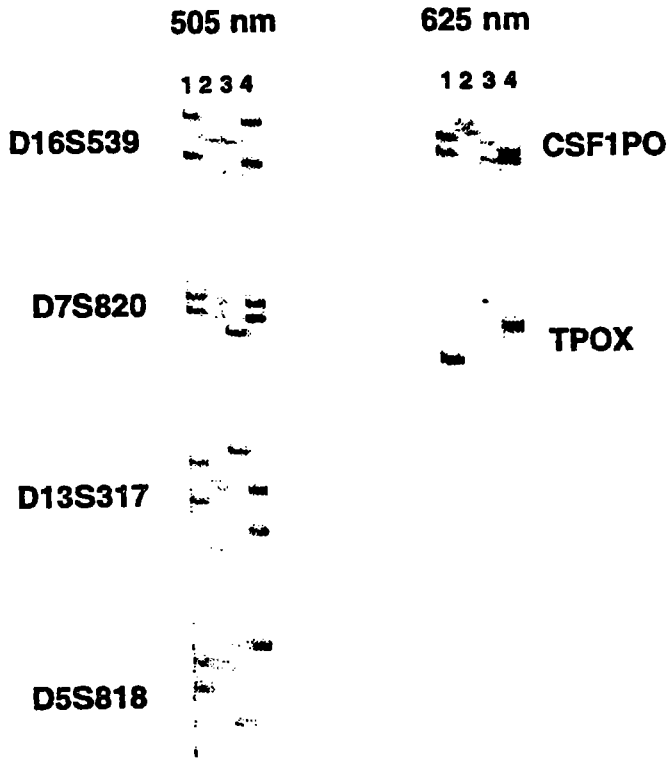

505 nm
625 nm
1 2 3 4
1 2 3 4
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
D5S818

图17

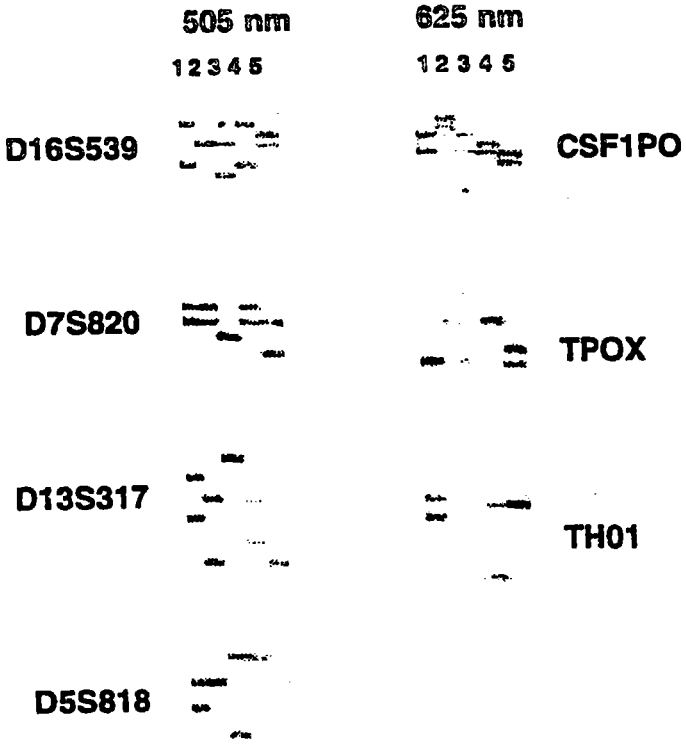

505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
TH01
D5S818

图18

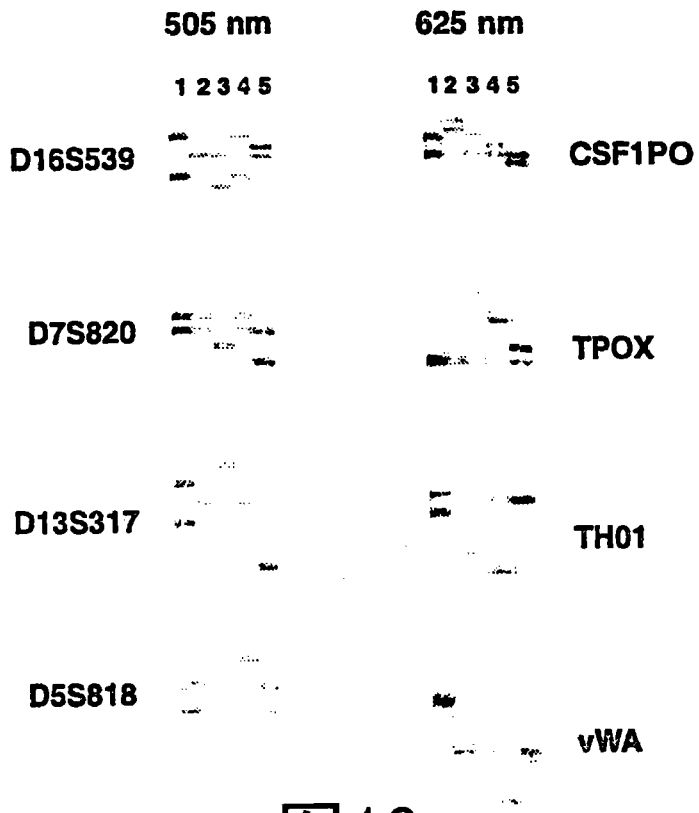

505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
CSF1PO
D7S820
TPOX
D13S317
TH01
D5S818
vWA

图19

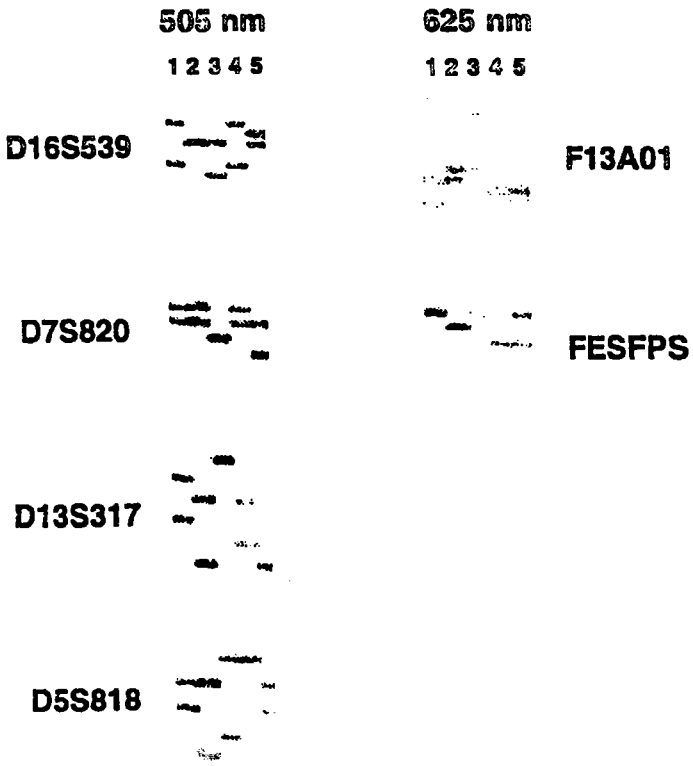

505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
D5S818

图20

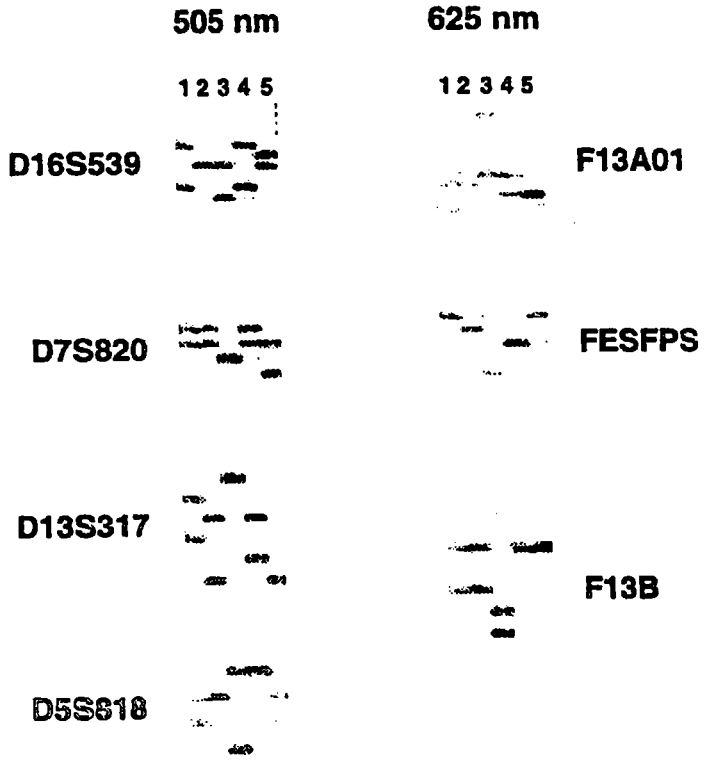

505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
F13B
D5S818

图21


505 nm
625 nm
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
D16S539
F13A01
D7S820
FESFPS
D13S317
F13B
D5S818
LPL

图22

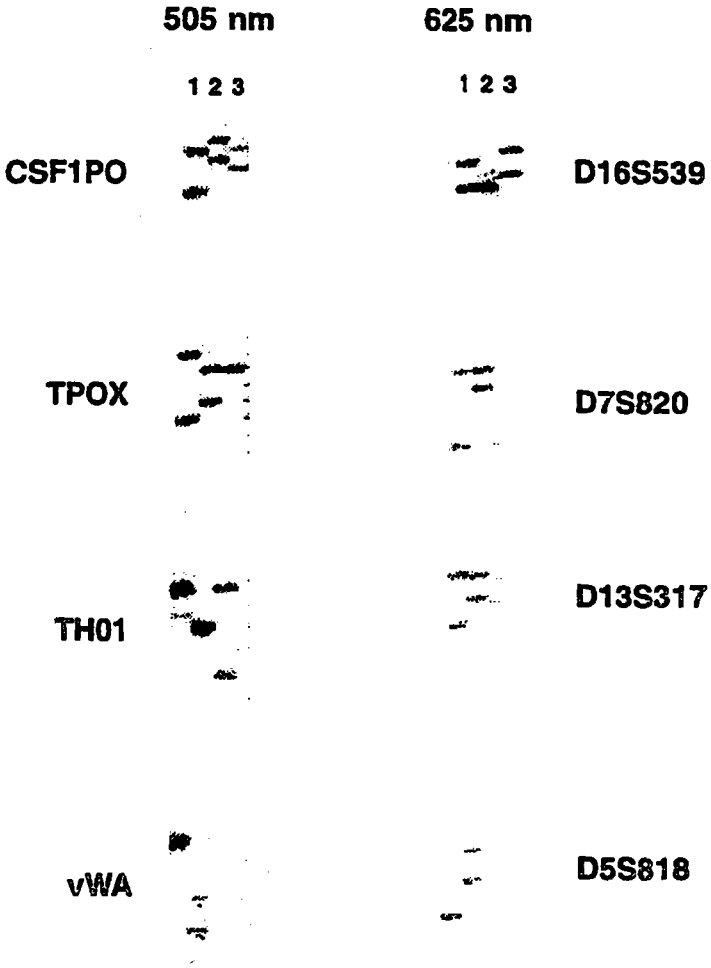

505 nm
625 nm
1 2 3
1 2 3
CSF1PO
D16S539
TPOX
D7S820
TH01
D13S317
vWA
D5S818

图23

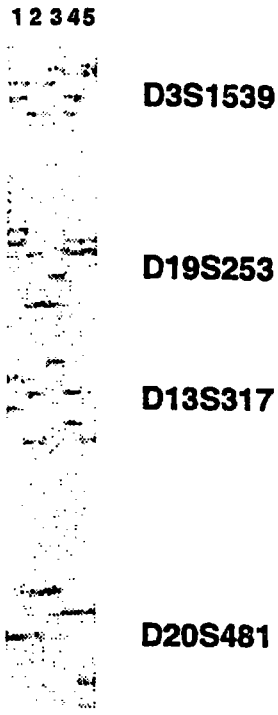

1 2 3 4 5
D3S1539
D19S253
D13S317
D20S481

图24

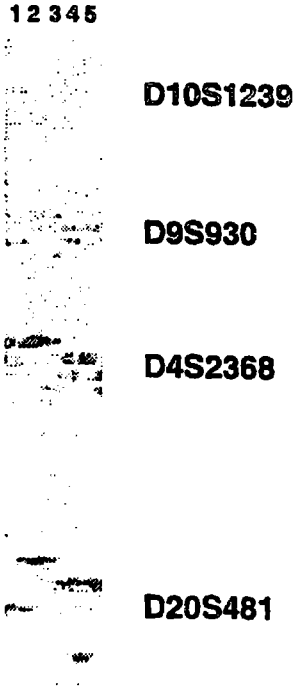

1 2 3 4 5
D10S1239
D9S930
D4S2368
D20S481

图25

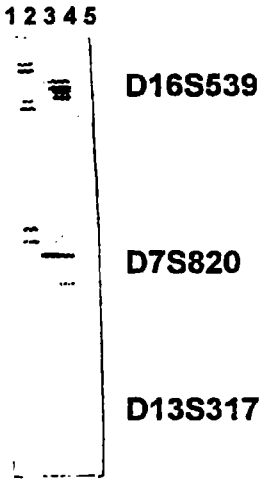

1 2 3 4 5
D16S539
D7S820
D13S317

图26

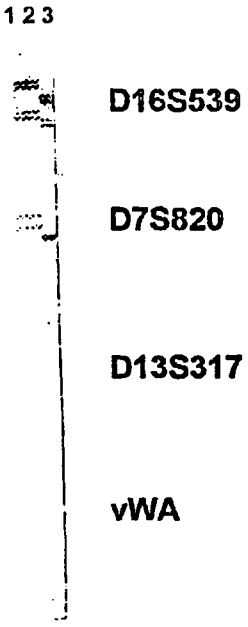

1 2 3
D16S539
D7S820
D13S317
vWA

图27

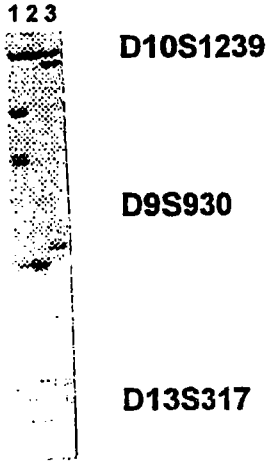

1 2 3
D10S1239
D9S930
D13S317

图28

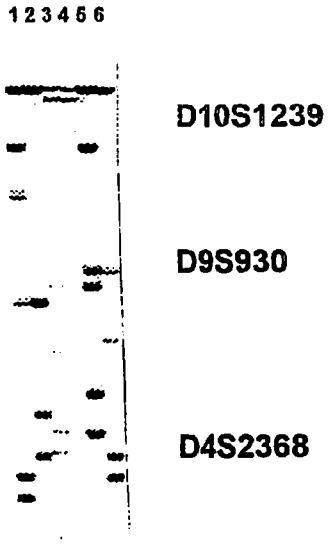

1 2 3 4 5 6
D10S1239
D9S930
D4S2368

图29

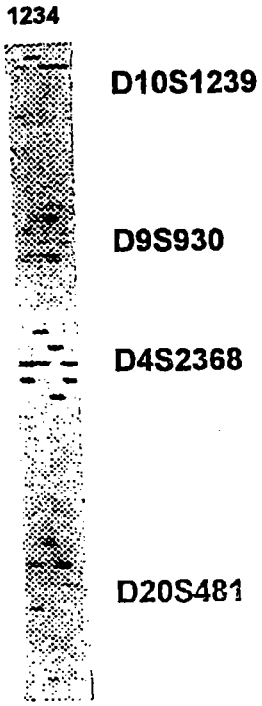

1234
D10S1239
D9S930
D4S2368
D20S481

图30

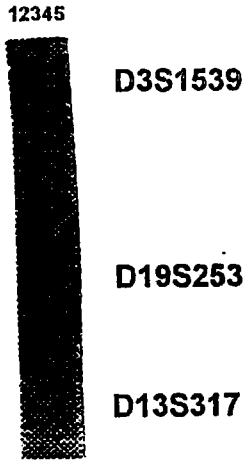

12345
D3S1539
D19S253
D13S317

图31

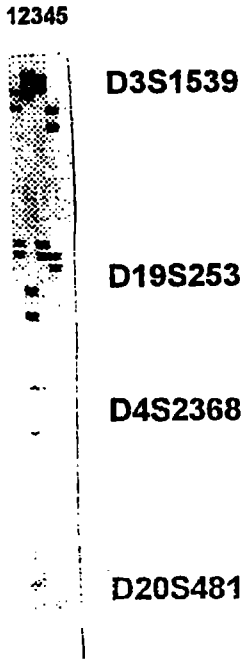

12345
D3S1539
D19S253
D4S2368
D20S481

图32

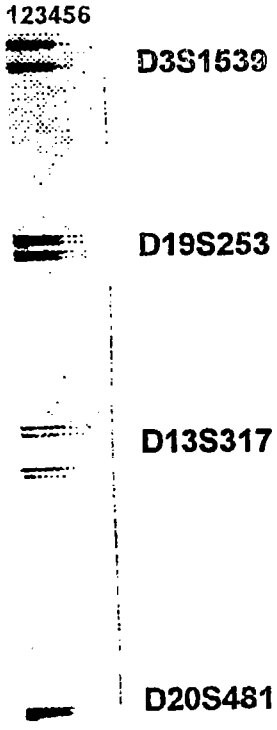

123456
D3S1539
D19S253
D13S317
D20S481

图33

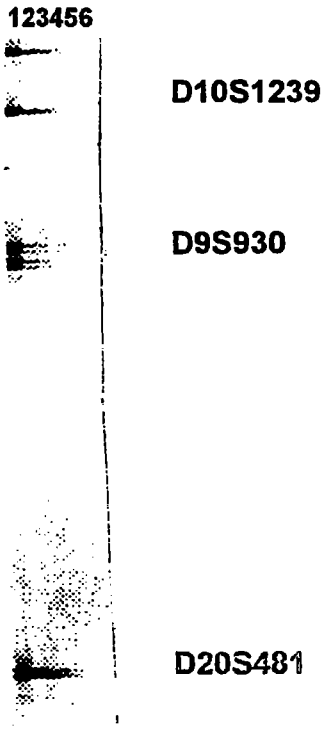

123456
D10S1239
D9S930
D20S481

图34


123456
D10S1239
D4S2368
D20S481

图35