



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201311952 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：101117168

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl. : C40B50/06 (2006.01)

C40B60/06 (2006.01)

(30)優先權：2011/05/12 美國

61/485,459

(71)申請人：網路生物有限公司(美國) NETBIO, INC. (US)

美國

(72)發明人：舒曼 詹姆士 W SCHUMM, JAMES W. (US) ; 舍爾登 李察 F SELDEN, RICHARD

F. (US) ; 譚 尤金尼 TAN, EUGENE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：29 項 圖式數：18 共 155 頁

(54)名稱

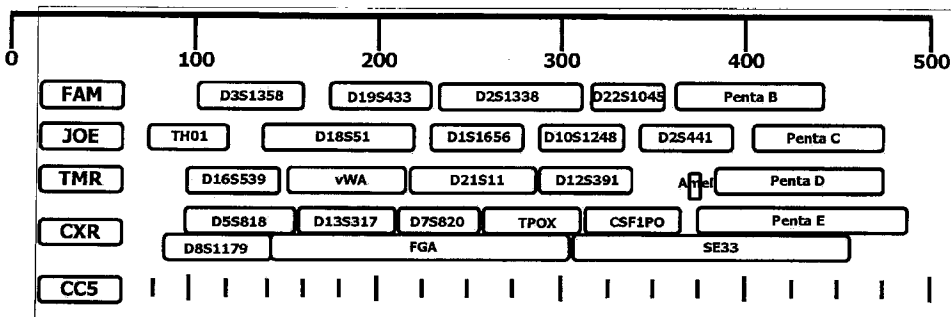
快速多重擴增 S T R 基因座之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR RAPID MULTIPLEX AMPLIFICATION OF STR LOCI

(57)摘要

本發明提供多重聚合酶鏈反應(PCR)擴增短串聯重複序列(short tandem repeat,STR)基因座之方法，其可用於自靶核酸快速產生高特異性 STR 圖譜(profile)。所得 STR 圖譜可用於法律執行、國土安全、軍事、情報及親子測試應用中之人類鑒定目的。

實例 1



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
26 基因座 - 5 染料	1487	411 鹼基	3.62



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201311952 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：101117168

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl. : C40B50/06 (2006.01)

C40B60/06 (2006.01)

(30)優先權：2011/05/12 美國

61/485,459

(71)申請人：網路生物有限公司(美國) NETBIO, INC. (US)

美國

(72)發明人：舒曼 詹姆士 W SCHUMM, JAMES W. (US) ; 舍爾登 李察 F SELDEN, RICHARD

F. (US) ; 譚 尤金尼 TAN, EUGENE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：29 項 圖式數：18 共 155 頁

(54)名稱

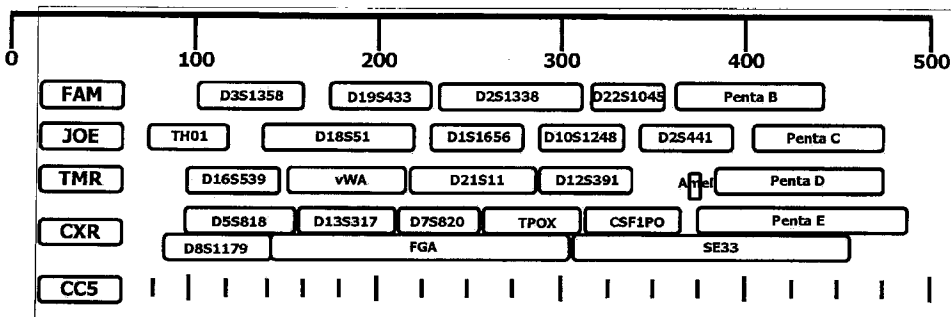
快速多重擴增 S T R 基因座之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR RAPID MULTIPLEX AMPLIFICATION OF STR LOCI

(57)摘要

本發明提供多重聚合酶鏈反應(PCR)擴增短串聯重複序列(short tandem repeat,STR)基因座之方法，其可用於自靶核酸快速產生高特異性 STR 圖譜(profile)。所得 STR 圖譜可用於法律執行、國土安全、軍事、情報及親子測試應用中之人類鑒定目的。

實例 1



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
26 基因座 - 5 染料	1487	411 鹼基	3.62

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明概言之係關於快速擴增核酸試樣內短串聯重複序列基因座之組合物及方法。

本申請案主張對2011年5月12日提出申請之臨時申請案第61/485,459號之優先權。

[併入之參考文獻]

本申請案以引用方式併入以下申請案之全部內容：美國申請案第11/132,712號，標題為「Ruggedized Apparatus for Analysis of Nucleic Acid and Proteins」；美國申請案第12/080,746號，標題為「Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids」；美國申請案第12/080,745號，標題為「Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms」；美國申請案第12/080,751號，標題為「Integrated Nucleic Acid Analysis」；及美國申請案第13/044,485號，標題為「Unitary Biochips」。

[政府補助]

本發明係根據國土安全部 (Department of Homeland Security) 之 SBIR 授予物第 N10PC2010S 號在政府支持下進行。政府可擁有本發明中的某些權利。

### 【先前技術】

聚合酶鏈反應 (PCR) 係促進活體外快速指數擴增核酸序列之酶促反應。在法醫學中，可利用 PCR 基於對人類基因組之小區域之擴增來鑒定個體，該等區域含有一類稱作短串聯重複序列 (STR) 之重複 DNA。給定 STR 重複之單元長

度之範圍介於2-10鹼基對之間，且STR通常屬於非編碼及側接序列內，但偶爾屬於編碼區域內(Edwards等人，Am. J. Hum. Genet. 1991, 49, 746-756)。人類基因組中平均每6-10 kb出現數十萬個STR基因座(Beckman及Weber, Genomics 1992, 12, 627-631)且其中許多具有高度多型性(Edwards等人，Trans. Assoc. Am. Physicians 1989, 102, 185-194)。STR分析已成為法醫設備中之主要工具，且其應用範圍日益增加，包括法律執行、親子測試、大規模災難中之人類鑒定及兒童之常規分型。

#### 【發明內容】

在一個態樣中，本發明提供多重擴增STR基因座之方法，其包含(a)在溶液中使試樣與STR基因座之至少6個不同引子對接觸，其中每對中之至少一個引子經螢光染料標記且其中所得STR多重體(multiplex)之多重密度等於或大於3.20；(b)在一個反應室中使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增以產生經擴增核酸產物；及(c)藉由雷射誘導之螢光檢測該等核酸產物。在有關態樣中，多重STR分析之多重密度係3.0或更大、3.1或更大、3.2或更大、3.3或更大、3.4或更大、3.5或更大、3.6或更大、3.7或更大、3.8或更大、3.9或更大、4.0或更大、4.2或更大、4.4或更大、4.6或更大、4.8或更大、5.0或更大、5.5或更大、6.0或更大、6.5或更大、7.0或更大、7.5或更大、8.0或更大、8.5或更大、9.0或更大、9.5或更大或10.0或更大。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16

種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測來檢測經染料標記片段。增加螢光染料之數目允許更大多重密度。

在另一態樣中，本發明提供多重擴增STR基因座之方法，其包含(a)在溶液中使試樣與STR基因座之至少6個不同引子對接觸，其中每對中之至少一個引子經螢光染料標記且其中使用至少6種不同螢光染料標記且其中所得STR多重體之STR基因座大小範圍總和大於1044；(b)在一個反應室中使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增以產生經擴增核酸產物；及(c)藉由雷射誘導之螢光檢測該等核酸產物。在有關態樣中，多重STR分析之STR基因座大小範圍總和係1050個鹼基或更大、1075個鹼基或更大、1100個鹼基或更大、1125個鹼基或更大、1150個鹼基或更大、1175個鹼基或更大、1200個鹼基或更大、1225個鹼基或更大、1250個鹼基或更大、1275個鹼基或更大、1300個鹼基或更大、1325個鹼基或更大、1350個鹼基或更大、1375個鹼基或更大、1400個鹼基或更大、1425個鹼基或更大、1450個鹼基或更大、1475個鹼基或更大、1500個鹼基或更大、1600個鹼基或更大、1700個鹼基或更大、1800個鹼基或更大、1900個鹼基或更大、2000個鹼基或更大、2500個鹼基或更大、3000個鹼基或更大、4000個鹼基或更大或5000個鹼基或更大。在一些實施例中，利用總共

4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。增加螢光染料之數目允許較大STR基因座大小範圍總和。

本文所提供某些態樣係關於多重擴增多型性基因座之方法，其包含(a)在一種溶液中使自一或多個源獲得之一或多個核酸模板之試樣與至少6個不同引子對接觸，每對與一或多個核酸模板中至少6個STR基因座中之一者雜交，其中標記該引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種(且在一些態樣中5種，且其他態樣中，超過6種)不同標記；(b)在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增一或多種核酸中之至少6個STR多型性基因座以產生至少6種核酸產物。在一些實施例中，擴增6個或更多個基因座。在一些實施例中，擴增7個或更多個、8個或更多個、9個或更多個、10個或更多個、11個或更多個、12個或更多個、13個或更多個、14個或更多個、15個或更多個、16個或更多個、17個或更多個、18個或更多個、19個或更多個、20個或更多個、21個或更多個、22個或更多個、23個或更多個、24個或更多個、25個或更多個、26個或更多個、27個或更多個、28個或更多個、29個或更多個、30個或更多個、31個或更多個、32個或更多個、34個或更多個、36個

或更多個、38個或更多個或40個或更多個STR基因座。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179之引子對及至少一個選自以下STR基因座集合之STR基因座之引子對：SE33、Penta C、Penta D、Penta E、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、DYS391及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重引子多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D16S539、vWA、D21S11、Penta D、D5S818、D13S317、

D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、FGA、D8S1179之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D16S539、vWA、D21S11、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、FGA、D8S1179之引子對及至少一個選自以下STR基因座集合之STR基因座之引子對：SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、FGA、D8S1179、D6S1043之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D16S539、vWA、D21S11、

D12S391、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、FGA、D8S1179、D6S1043之引子對及至少一個選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：SE33、D10S1248、D2S441、Penta C、D22S1045及DYS391。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、CSF1PO、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、CSF1PO、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少一個選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：SE33、Penta C、Penta D、TPOX、Penta E、D22S1045及

D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少兩個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少一個分別選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：Penta C、Penta D、Penta E、SE33及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28

種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、SE33、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、SE33、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179之引子對及至少一個選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：Penta C、Penta D、Penta E及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記

物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、TH01、D18S51、D16S539、vWA、D21S11、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、FGA、D8S1179之引子對及至少6個各自分別擴增至至少一個額外STR基因座之額外引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、TH01、D18S51、D16S539、vWA、D21S11、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、FGA、D8S1179之引子對及至少6個額外引子對，該等額外引子對含有至少1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個或12個選自以下STR基因座集合之額外STR基因座之至少一個引子對：D19S433、D2S1338、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、Penta D、Penta E、D22S1045及DYS391。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、

D1S6156、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179之引子對及至少兩個各自分別擴增至至少一個額外STR基因座之額外引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D16S539、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179之引子對及至少兩個額外引子對，該等額外引子各自分別擴增至至少一個選自以下STR基因座之群之額外STR基因座：SE33、Penta C、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、DYS391及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、D18S51、D16S539、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、CSF1PO、FGA、D8S1179及D6S1043之引子對及至少一個額外STR基因座之引子對。在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、

D18S51、D16S539、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、CSF1PO、FGA、D8S1179及D6S1043之引子對及至少一個分別選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：SE33、TH01、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、vWA、Penta D、D22S1045、Penta E、SE33及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析含有STR基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、D18S51、D16S539、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D5S818、D13S317、D7S820、CSF1PO、D22S1045、FGA及D8S1179之引子對，且具有或不具有至少一個分別選自以下STR基因座集合之STR基因座之額外引子對：SE33、Penta C、Penta D、TPOX、Penta E、DYS391及D6S1043。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35

種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。在一些實施例中，可視情況在多重體中包括用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物。

在一些實施例中，多重STR分析之多重密度係3.0或更大、3.1或更大、3.2或更大、3.3或更大、3.4或更大、3.5或更大、3.6或更大、3.7或更大、3.8或更大、3.9或更大、4.0或更大、4.2或更大、4.4或更大、4.6或更大、4.8或更大、5.0或更大、5.5或更大、6.0或更大、6.5或更大、7.0或更大、7.5或更大、8.0或更大、8.5或更大、9.0或更大、9.5或更大或10.0或更大。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。增加螢光染料之數目允許更大多重密度。

在一些實施例中，多重STR分析之STR基因座大小範圍總和係1044個鹼基或更大、1050個鹼基或更大、1075個鹼基或更大、1100個鹼基或更大、1125個鹼基或更大、1150個鹼基或更大、1175個鹼基或更大、1200個鹼基或更大、1225個鹼基或更大、1250個鹼基或更大、1275個鹼基或更大、1300個鹼基或更大、1325個鹼基或更大、1350個鹼基或更大、1375個鹼基或更大、1400個鹼基或更大、1425個

鹼基或更大、1450個鹼基或更大、1475個鹼基或更大、1500個鹼基或更大、1600個鹼基或更大、1700個鹼基或更大、1800個鹼基或更大、1900個鹼基或更大、2000個鹼基或更大、2500個鹼基或更大、3000個鹼基或更大、4000個鹼基或更大或5000個鹼基或更大。在一些實施例中，利用總共4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子(標記每一引子對中之一個成員)，且基於雷射激發及檢測檢測經染料標記片段。增加螢光染料之數目允許較大STR基因座大小範圍總和。

使用6種或更多個螢光標記(例如，6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種或更多種標記)提供許多優點。例如，當對經降解DNA試樣進行操作時，在多重STR評估中使用小擴增子增加產生所有期望擴增產物之可能性。使用6種或更多種標記染料藉由以下方式增加經降解DNA試樣成功之機會：藉由允許在大於引子及引子二聚物之偽產物(artifact)之最小可能範圍內設計額外基因座來減少基因座之平均擴增子大小。在一些實施例中，在多重集合中擴增6個或更多個基因座，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施例中，在多重集合中擴增12個或更多個基因座，其中標記每一引

子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施例中，在多重集合中擴增6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、40個、45個、50個或更多個基因座，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。明確設想，政府將隨時間批准額外基因座且設想在多重集合中使用多種色彩中之6種來達成27個以上基因座。可替代多個基因座中之一者。例如，FBI目前正考慮將TPOX基因座自其目前必需狀態降級至推薦狀態，對於欲進入美國CODIS數據庫之試樣圖譜亦如此。

可詢問之STR基因座之色彩及數目之此增加亦將降低異常匹配之發生率(關於DNA-數據庫管理2010之ENFSI文件，參見：<http://www.enfsi.org/>)且將增加執行許多其他基於STR之應用之信任度。例如，DNA圖譜分析之作用亦已擴展至包括對數據庫之家族式搜索(Bieber等人，Finding criminals through DNA of their relatives. Science. 2006; 312(5778):1315-6；Nothnagel等人，Potentials and limits of pairwise kinship analysis using autosomal short tandem repeat loci. Int J Legal Med. 2010; 124(3): 205-15)且在難民、避難者及移民申請中採用親屬關係分析(Baker等人 Reuniting Families: An Online Database to Aid in the

Identification of Undocumented Immigrant Remains\*. J Forensic Sci. 2008; 53(1):50-3 ; Preston. US set to begin a vast expansion of DNA sampling; big effect on immigrants; law to cover most people detained or arrested by federal agents. The New York times. 2007:A1, A15)。

使用6種或更多種標記之另一優點係基於以下事實：若干國家已界定標準STR基因座集合用於產生國家數據庫，其用於輔助鑒定各種罪行之犯罪者 (Budowle 等人 Population Data on the Thirteen CODIS Core Short Tandem Repeat Loci in African-Americans, US Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. J Forensic Sci. 1999; 44:1277-86 ; Butler. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. J Forensic Sci. 2006 Mar; 51(2):253-65 ; Gill 等人 New multiplexes for Europe--Amendments and clarification of strategic development. Forensic Sci Int. 2006; 163(1-2):155-7)。該等標準集合在各國之間有所不同。地區、國家及國際數據庫之大小已隨時間而增加，且期望跨國界共享STR圖譜數據。數據庫搜索相容性將自可同時分析之STR基因座之數目的增加受益。使用6種或更多種標記允許產生基本上納入所有個別國家中所用STR基因座之新國際STR標準。

存在可納入多重STR分析中之STR基因座之若干類別。其包括體染色體STR (大多數彼等上文所述者)、X STR、Y

STR及微型-STR (體染色體STR、Y-STR及X-STR之較低分子量形式)。STR分析可由在給定分析中一種STR基因座或STR基因座之組合組成(例如，可一起詢問體染色體-STR、X-STR及Y-STR)。

在欲評估直系男性-男性遺傳之情形下，對地理祖先之親屬關係分析及研究自使用Y染色體STR標記物顯著受益。在一些實施例中，在多重集合中擴增6個或更多個Y染色體STR基因座(其中對於一些應用而言，6個、8個、10個、12個、14個、15個、18個、21個、24個、27個、30個或更多個Y染色體STR基因座較佳)，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施例中，在多重集合中擴增18個或更多個基因座，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施例中，在多重集合中擴增18個或更多個具有至少一個選自以下之基因座：DYS19、DYS378I、DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、DYS385a/b、DYS437、DYS438、DYS439、DYS472、DYS476、DYS480、DYS481、DYS485、DYS487、DYS488、DYS490、DYS491、DYS492、DYS494、DYS495、DYS497、DYS505、DYS508、DYS511、DYS522、DYS525、DYS530、DYS531、DYS533、DYS537、DYS540、DYS549、DYS554、DYS556、DYS565、DYS567、DYS568、DYS569、DYS570、DYS572、DYS573、DYS575、DYS576、

DYS578 、 DYS579 、 DYS580 、 DYS583 、 DYS589 、  
DYS590 、 DYS594 、 DYS617 、 DYS618 、 DYS636 、  
DYS640、DYS641或DYS643，其中標記每一引子對中之至少  
一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施  
例中，在多重集合中擴增24個或更多個具有至少一個選自  
以下之基因座：DYS19、DYS378I、DYS389II、DYS390、  
DYS391、DYS392、DYS393、DYS385a/b、DYS437、  
DYS438、DYS439、DYS472、DYS476、DYS480、  
DYS481、DYS485、DYS487、DYS488、DYS490、  
DYS491、DYS492、DYS494、DYS495、DYS497、  
DYS505、DYS508、DYS511、DYS522、DYS525、  
DYS530、DYS531、DYS533、DYS537、DYS540、  
DYS549、DYS554、DYS556、DYS565、DYS567、  
DYS568、DYS569、DYS570、DYS572、DYS573、  
DYS575、DYS576、DYS578、DYS579、DYS580、  
DYS583、DYS589、DYS590、DYS594、DYS617、  
DYS618、DYS636、DYS640、DYS641或DYS643，其中標  
記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不  
同標記。

在一些實施例中，在多重集合中擴增30個或更多個具有  
至少一個選自以下之基因座：DYS19、DYS378I、  
DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、  
DYS385a/b、DYS437、DYS438、DYS439、DYS472、  
DYS476、DYS480、DYS481、DYS485、DYS487、

DYS488 、 DYS490 、 DYS491 、 DYS492 、 DYS494 、  
DYS495 、 DYS497 、 DYS505 、 DYS508 、 DYS511 、  
DYS522 、 DYS525 、 DYS530 、 DYS531 、 DYS533 、  
DYS537 、 DYS540 、 DYS549 、 DYS554 、 DYS556 、  
DYS565 、 DYS567 、 DYS568 、 DYS569 、 DYS570 、  
DYS572 、 DYS573 、 DYS575 、 DYS576 、 DYS578 、  
DYS579 、 DYS580 、 DYS583 、 DYS589 、 DYS590 、  
DYS594 、 DYS617 、 DYS618 、 DYS636 、 DYS640 、  
DYS641或DYS643，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。

在親屬關係、法醫學及人類學之複雜缺陷情形下，X染色體標記物尤其可用於分析。男性之X-染色體圖譜作為單倍型傳遞至後代，使其成為家族鑒定之高度多型性組合系統。在一些實施例中，在多重集合中擴增6個、7個、8個、9個、10個、12個、14個、16個、18個、20個、25個、30個或更多個X染色體STR基因座，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。在一些實施例中，在多重集合中擴增13個或更多個具有至少一個選自以下之基因座：DXS6807、DXS9895、DXS10135、DXS8378、DXS9902、DXS10076、DXS10077、DXS10078、DXS7132、DXS10074、DXS981、DXS6800、DXS9898、DXS6801、DXS6809、DXS6789、DXS7424、DXS101、DXS6797、DXS7133、GATA172D05、HPRTB、DXS10101、DXS9908、

DXS8377 、 DXS10134 、 DXS7423 、 DXS10011 、 DXS10102 、 DXS10103 、 DXS10104 、 DXS10105 、 DXS10106或DXS10107，其中標記每一引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記。

在一些實施例中，將13個CODIS基因座(即，CSF1PO、D3S1358、D5S818、D7S820、D8S1179、D13S317、D16S539、D18S51、D21S11、FGA、TH01、TPOX、vWA)中至少5個之引子對及至少一個Y-標記物納入多重體中。在另一實施例中，將13個CODIS基因座中至少5個之引子對、至少一個Y-標記物及兩個或更多個來自包括以下之群之標記物納入多重體中：D1S1656、D2S441、D2S1338、D6S1043、D10S1248、D12S391、D19S433、Penta B、Penta C、Penta D、Penta E、D22S1045及SE33。在該等實施例中，利用總共5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種或更多種螢光染料來標記引子(每一引子對一種標記)，且用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物可視情況包括在多重體中(此可選標記物與至少一個上文所提及Y-標記物不同)。

在一些實施例中，將13個CODIS基因座(即，CSF1PO、D3S1358、D5S818、D7S820、D8S1179、D13S317、D16S539、D18S51、D21S11、FGA、TH01、TPOX、vWA)中至少5個之引子對及至少一個X-標記物納入多重體中。在另一實施例中，將13個CODIS基因座中至少5個之引子對、至少一個X-標記物及兩個或更多個來自包括以下之群

之標記物納入多重體中：D1S1656、D2S441、D2S1338、D6S1043、D10S1248、D12S391、D19S433、Penta B、Penta C、Penta D、Penta E、D22S1045及SE33。在該等實施例中，利用總共5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種或更多種螢光染料來標記引子(每一引子對一種標記)，且用於性別鑒定之牙釉蛋白或另一標記物可視情況包括在多重體中(此可選標記物與至少一個上文所提及X-標記物不同)。

在一些實施例中，引子對中之正向或反向引子或二者經獨特地標記(例如，用螢光染料)。在一些實施例中，標記係螢光染料。在一些實施例中，使用雷射(例如藍寶石488 nm雷射)檢測經螢光標記擴增子。使用雷射之優點在於分析之檢測敏感度及極限與(例如)板式計數器相比顯著改良。

在一些實施例中，在以下時間內擴增核酸產物：小於約180分鐘、小於120分鐘、小於90分鐘、小於80分鐘、小於70分鐘、小於60分鐘、小於55分鐘、小於50分鐘、小於45分鐘、小於40分鐘、小於35分鐘、小於30分鐘、小於25分鐘、小於20分鐘、小於18分鐘、小於17分鐘、小於16分鐘、小於15分鐘、小於14分鐘、小於13分鐘、小於12分鐘、小於11分鐘、小於10分鐘、小於9分鐘、小於8分鐘、小於7分鐘、小於5分鐘或小於約4分鐘。

對於本文所提供實施例中任一者中所述之方法而言，反應室可位於微流體生物晶片上(例如，參見Giese等人

(2009), 「Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis.」 *J Forensic Sci* 54(6): 1287-96)。此外，反應室可位於完全整合之微流體生物晶片上，該晶片能夠對一或多個在不要求操作者操作之試樣入-結果出系統(sample-in to results out system)之環境中平行的試樣實施一系列複雜處理步驟。在一些實施例中，該等方法包含電泳分離並檢測核酸產物。在一些實施例中，核酸產物之分離及/或檢測係在微流體生物晶片上實施。

在本文所述實施例中之任一者中，試樣可包含約1 pg至超過10  $\mu$ g之一或多種核酸(模板)。在一些實施例中，試樣包含小於1 ng之一或多種核酸(模板)。在某些態樣中，對於在0.05 ng至4.0 ng之範圍內之核酸模板量而言，每一核酸產物之異型接合峰高比(PHR)介於0.6與1.0之間。

本發明其他態樣係關於快速多重擴增多型性基因座之套組，其包含：(a)鹽、緩衝液、dNTP及聚合酶；(b)一套選自彼等上文所述者之STR引子對，每一引子對具有正向引子及反向引子且與一或多種核酸或核酸混合物中至少6個基因座中之一者雜交，其中每一引子對之正向或反向引子或二者經螢光染料標記；(c)快速多重擴增STR基因座之組份(例如鹽、緩衝液、鎂、dNTP及聚合酶)，其中將組份(a)、(b)及(c)置於單一反應容器內。

在本文所述實施例中之任一者中，可利用任何DNA聚合酶。實例包括水生棲熱菌(*Thermus aquaticus*) (Taq)、強烈

火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) (Pfu)、伍斯氏火球菌 (*Pyrococcus woesei*) (Pwo)、黃棲熱菌 (*Thermas flavus*) (Tfl)、嗜熱棲熱菌 (*Thermus thermophilus*) (Tth)、利托氏棲熱菌 (*Thermus litoris*) (Tli)及海棲熱袍菌 (*Thermotoga maritima*)(Tma)。該等酶、該等酶之經修飾形式及酶之組合可購自供應商，包括 Roche、Invitrogen、Qiagen、Stratagene及 Applied Biosystems。代表性酶包括 PHUSION (New England Biolabs, Ipswich, Mass.)、Hot MasterTaq.TM. (Eppendorf)、PHUSION Mpx (Finnzymes)、PyroStart (Fermentas)、KOD (EMD Biosciences)、Z-Taq (TAKARA)及 CS3AC/LA (KlenTaq, University City, Mo.)。

本發明之教示內容可應用於達成核酸擴增之任何方法，包括(但不限於)多重端點PCR、即時PCR、反轉錄PCR、不對稱PCR、巢式PCR、LATE PCR、降落式PCR (touchdown PCR)、數位PCR、等溫PCR、滾環式擴增、鏈替代擴增及多重置換擴增。

可應用本發明之教示內容來分析以在給定基因座處之不同等位基因大小為特徵之任何多重基因座。多重STR分析可應用於多種生物體，包括非人類哺乳動物、魚、鳥、爬行動物及兩棲動物物種。另外，可利用本發明藉由多基因座可變數串聯重複分析 (MLVA)及擴增片段長度多型性 (AFLP)分析來鑒定並表徵細菌(包括病原體)。該等方法與STR分析相似且亦可廣泛應用於植物、真菌及動物之品系分型及表徵。可應用本發明之教示內容來分析非多型性基

因座或多型性基因座與非基因座基因座之組合。最終，本發明可直接應用於單核苷酸多型性(SNP)之多重體。

### 【實施方式】

本文闡述用於遺傳分析之方法。該等方法中之一些實施例經設計以提供一或多個核酸模板之高特異性遺傳圖譜，例如短串聯重複序列(STR)圖譜。每一圖譜提供給定核酸模板內多個多型性基因組基因座之DNA「指紋」，其隨後可一些實施例中用於鑒定獲得該核酸模板之個體(或關於該個體或該個體之血親之資訊)。

本發明之目標係提供產生用於多種應用中之人類鑒定資訊之多重STR分析。例如，法醫實驗室最近已確定家族性搜索(即，搜索源自犯罪現場試樣之圖譜與存在於州、國家或國際數據庫中之圖譜間之關係)之漸增性價值，以藉由將潛在嫌疑犯列表縮小至屬於該數據庫之圖譜之個體之家族成員來輔助研究。本發明分析為家族性搜索提供實質上更多之信任度且顯著減少大小漸增之搜索數據庫中獲得之異常匹配之數目。

本發明分析之較大辨別力亦增強DNA圖譜分析在分析移民及難民申請中之用途。在該等情形下，與個體權利有關且與美國公民或特定難民有關之美國國務院政策之實施可以較大正確結果信任度執行。儘管13 CODIS STR基因座之測試在測試親子關係及同胞關係方面提供足夠保證，但對諸如祖孫或姑姨/叔舅-侄甥(nephew/niece)等進一步伸延之關係進行親屬關係分析會導致許多信任度有限之結果。增加

STR基因座之數目及/或選擇更多用於測試之多型性基因座會增加用於親屬關係分析之概度比之強度，從而增加結果之信任度並降低潛在詐欺風險。本發明分析亦提供評估有時自法醫試樣獲得之經降解DNA試樣之優點。

儘管STR分析已成為證據性黃金標準，但STR基因座集合尚未經國際標準化。在美國，聯邦調查局(Federal Bureau of Investigation)選擇13個STR基因座及牙釉蛋白基因座(用於性別確定)以供與組合式DNA Index System (CODIS)結合使用。美國集合(US set)經常稱作「CODIS核心基因座」且係由STR基因座CSF1PO、FGA、THO1、TPOX、VWA、D3S1358、D5S818、D7S820、D8S1179、D13S317、D16S539、D18S51及D21S11組成。一般而言，每一STR基因座係針對所發現之染色體命名(例如D3S1358係位於人類染色體3上)或針對鄰近基因命名(例如CSF1PO係位於編碼集落刺激因子-1受體基因之人類c-fms原癌基因受體之基因的含子內)。英國核心基因座係FGA、THO1、VWA、D2S1338、D3S1358、D8S1179、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11及牙釉蛋白。歐洲核心基因座係FGA、ThO1、VWA、D1S1656、D2S441、D3S1358、D8S1179、D10S1248、D12S391、D18S51、D21S11、D22S1045及牙釉蛋白。奧地利政府將D2S1338、D16S539及D19S433添加至歐洲核心基因座，且德國政府添加基因座SE33。在中國，基因座D6S1043經常與STR基因座CSF1PO、FGA、vWA、D2S1338、D3S1358、D5S818、

D7S820、D8S1179、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11及牙釉蛋白組合利用。Interpol標準集合基因座係FGA、TH01、VWA、D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11及視情況牙釉蛋白。

本發明提供STR分析，其同時詢問全世界選擇用於納入國家數據庫中之所有STR基因座及含有該等基因座之子集合。此一國際STR標準集合將顯著改良國家間之有效合作，從而改良社會安全性。熟習此項技術者應瞭解，在設計並構築多重STR分析時，必須平衡許多因素。該等因素尤其在分析中之STR基因座之數目增加到高於18時會變得較難以平衡。必須平衡之因素包括STR偽產物(例如iNTA及兩種或更多種引子與試樣核酸之不期望相互作用產物)之預防或去除、絕對及相對信號強度、反應效率及時間、STR基因座重疊、STR擴增子解析度、STR基因座大小範圍及可耐受重疊程度、STR基因座異型接合度、反應中所用螢光染料標記之數目、多重大小範圍以及一或多種實施反應之儀器之規格及性能。該等因素已阻止STR分析在多重密度大於約3.15且STR基因座大小範圍總和為1022之單一同時反應中超過18個正式基因座。端視期望結果而定，可應用該等工具及教示內容以允許將大得多數目之正式基因座納入STR多重體中，並達成大得多之多重密度及STR基因座大小範圍總和。

本文所用術語「STR基因座(STR locus及STR loci)」意

指於靶核酸之給定基因座處由兩個或更多個核苷酸之重複模式組成之核苷酸序列。重複模式之長度可在約2個至約10個鹼基對(bp)範圍內，且通常在非編碼內含子區域內。重複模式可含有不與重複單元對應之插入序列，或可含有一種以上之重複模式。

本文所用術語「STR等位基因」或「等位基因」係指在個體基因組中發現之STR基因座之形式。給定STR基因座可係異型接合，此意指兩個等位基因(每一個遺傳自每一生物學親本)具有不同長度及鹼基對組成，或可係同型接合，此意指兩個等位基因具有相同長度(及通常但並非總是鹼基對組成)。罕見地，對於給定STR基因座，個體可具有3個或更多個等位基因。偶爾，個體於給定STR基因座處之等位基因可因一或多個突變而與其親本不同。

本文所用術語「等位基因分型標準物(allelic ladder)」係指長度對應於針對每一STR基因座觀察到之常見等位基因之DNA集合。不同商業STR套組在代表每一基因座之等位基因分型標準物中具有不同等位基因。

本文所用術語「STR基因座大小範圍」或「基因座大小範圍」係指群體中觀察到之常見等位基因之大小範圍。假定已在數千萬測試個體中之一個或幾個中測試或觀察任何特定數目之DNA試樣，則可能觀察不到不常見等位基因。由於商業套組具有不同大小範圍(公司往往隨時間將罕見等位基因添加至其等位基因分型標準物中)，因此重要的

是，針對所有所關注STR基因座界定STR基因座大小範圍。此一界定允許將各種STR分析相互比較。不常見等位基因可能無法納入任何特定等位基因分型標準物中或可出於方便性不納入。等位基因分型標準物不必含有所有已知等位基因，此乃因額外等位基因可藉由與現有等位基因分型標準物組份進行大小比較來鑒定。使用市售等位基因分型標準物集合中每一基因座之最大與最小等位基因之間的大小差異來界定標準STR基因座大小範圍且其提供於表1中。下文比較中包括之STR基因座大小範圍係藉由比較以下可在線獲得之商業公開技術材料來確定：Applied Biosystems 產品 AmpF1STR Identifiler、AmpF1STR Identifiler Plus、AmpF1STR Identifiler Direct、AmpF1STR NGM Select、AmpF1STR Sinofiler與 Promega 公司產品 PowerPlex 16 HS、PowerPlex ESX 17及PowerPlex 18D。對於每一基因座而言，確定上述技術材料中所述組合式市售等位基因分型標準物集合中之最大與最小等位基因。然後基於重複數目及在基因座處存在4-鹼基抑或5-鹼基重複長度來確定最大與最小等位基因之間之鹼基大小差異。每一基因座指定一個稱為該基因座之「基因座標準大小範圍」之值。使用該等個別值來確定「多基因座大小範圍總和」(即，含於每一多重體內之個別基因座之所有標準大小範圍的總和)

表1之STR基因座可分成4類：1)由一或多個國家官方認可之基因座：CSF1PO、FGA、THO1、TPOX、VWA、D1S1656、D2S441、D2S1338、D3S1358、D5S818、D7S820、D8S1179、D10S1248、D12S391、D13S317、D16S539、D18S51、D19S433、D21S11、D22S1045、SE33及牙釉蛋白；2)廣泛用於中國之基因座：D6S1043；3)提議用於美國之基因座：DYS391；及4) 3個用於商業STR套組中之基因座：Penta B、C、D及E。總之，將含於該等4個類別中之任一STR基因座稱為「正式STR基因座」。一般而言，目前該等類別中之基因座已經受嚴格驗證及測試。可隨時間將新基因座添加至上述類別中：1)由一或多個國家官方認可之新基因座；2)廣泛用於一或多個國家但未經官方認可之新基因座；3)提議用於美國之新基因座；及4)商業套組中發現之新基因座。對於隨後成為該等類別中一者之成員的新基因座而言，可使用基因座之最大及最小等位基因之公開限制來界定每一STR基因座之大小範圍。對於不屬於該等4個類別中一者之「非正式」STR基因座而言，可使用基因座之最大及最小等位基因之公開限制來界定每一STR基因座之大小範圍。

表1.

	CSF1PO	D1S1656	D2S441	D2S1338	D3S1358	D5S818	D6S1043	D7S820	D8S1179	D10S1248	D12S391	D13S317	D16S539	D18S51	D19S433	D21S11	D22S1045	FGA	Penta B	Penta C	Penta D	Penta E	SE33	THO1	TPOX	VWA	DYS391
基因座標準大小範圍	36	47	36	72	44	36	64	36	48	44	52	32	48	80	52	56	52	146	70	55	73	95	150	43	28	56	28

本文所用術語「實質上非重疊STR分析」係指STR多重分析，其中等位基因之STR基因座大小範圍不與經相同染料(或視需要其他檢測方法)標記之基因座之任何其他STR基因座大小範圍重疊，此不包括極罕見且在STR基因座大小範圍之外之等位基因。

本文所用「STR基因座大小範圍總和」係指包括在多重STR集合中之基因座之個別STR基因座大小範圍的總和。例如，實例I之26-基因座STR集合之STR基因座大小範圍總和係1487個鹼基且Identifiler基因座(Life Technologies)之16-基因座STR集合之STR基因座大小範圍總和係809個鹼基。

本文所用「多重大小範圍」係指給定STR多重體之任一基因座之最大等位基因與該多重體之任一基因座之最小等位基因的大小差。該兩個基因座及多重大小範圍係特定多重體之特性。為計算多重大小範圍：1)鑒定多重體中含有最小常見等位基因之STR基因座；2)確定該基因座中最小常見等位基因之大小(使用與針對「STR基因座大小範圍」所述相同之方法；3)鑒定多重體中含有最大標準等位基因之STR基因座；4)確定該基因座中最大標準等位基因之大小(使用與針對「STR基因座大小範圍」所述相同之方法；5)計算該兩個標準等位基因之間之差。例如，實例I之26-基因座STR集合之多基因座大小範圍係411個鹼基且

Identifiler 集合 (Life Technologies) 之 16-基因座 STR 集合之多重大小範圍係 257 個鹼基。

若干因素影響用於給定分析中之多重大小範圍。STR 等位基因可使用包括電泳及質譜法在內之多種方法來表徵。對於電泳分離而言，例如，難以區分短擴增子與 STR 引子、引子二聚物或其他擴增偽產物之大小可影響大小下限。解析相差一或幾個鹼基之大等位基因之能力降低之系統的解析度可影響大小上限。類似地，給定分析中之等位基因愈大，經降解 DNA 試樣不會具有足以允許大量擴增該等大等位基因之平均片段長度的可能性愈大。

對於 MALDI-TOF (基質輔助雷射去吸附/離子化飛行時間) 質譜法而言，STR 片段之大小係基於以下情形：利用雷射對含有片段之試樣實施脈衝及量測與質量標準相比到達檢測器之飛行時間。質譜分光光度計不能檢測或解析 STR 等位基因可影響大小上限。應注意，MALDI-TOF 產生 STR 片段之精確分子量且因此無需等位基因分型標準物。為允許與基於電泳之方法進行直接比較，計算 STR 基因座大小範圍總和、多重大小範圍及多重密度，如上文所述。由於利用質譜法之準確性增加，因此可對 STR 等位基因進行可靠地分型而不與等位基因分型標準物進行比較。絕對質量係利用質譜法而非如電泳分析中之相對移動率量測 (與 DNA 定大小標準相比) 來量測。然後 GeneTrace 設計之基因

分型軟體基於自參考序列獲得之預計等位基因質量、PCR引子位置及重複單元質量將所觀察到之峰質量與基因型回溯相關。可對每一試樣進行處理並使用標準桌上型個人電腦在約1秒內進行基因分型。

本文所用「多重密度」定義為「STR基因座大小範圍總和」除以「多重大小範圍」。此值係可自給定多重體獲得之STR資訊之密度的量度。較高值指示，多重體展示在允許用於檢測之有限大小範圍內之較大等位基因範圍。例如，表2展示若干STR集合之STR基因座之總數、正式STR基因座之數目、染料數目、多重大小範圍、多重大小範圍總和及多重密度。該表亦包括基因座標準大小範圍及允許確定該等值之潛在數據。本發明STR集合之多重密度係至少2或更大、2.25或更大、2.5或更大、2.75或更大、2.93或更大、3.00或更大、3.1或更大、3.2或更大、3.3或更大、3.4或更大、3.5或更大、3.6或更大、3.7或更大、3.8或更大、3.9或更大、4.0或更大、4.1或更大、4.2或更大、4.3或更大、4.4或更大、4.5或更大、5或更大、6或更大、7或更大、8或更大、9或更大或10或更大。



本文所用術語「基因座 (locus及 loci (複數))」意指給定物種之全部或部分基因組內之一或多個具體位置，如本文所定義。

本文所用術語「高度多型性基因座 (highly polymorphic locus或 highly polymorphic loci)」係指多型性資訊含量為至少 0.5 之基因座 (基因座，其每一者)。多型性資訊含量 (PIC) [Botstein D、White RL、Skolnick M及 Davis RW，1980. Am J Hum Genet 32:314-331，其揭示內容併入本文中]，其每一者為熟習此項技術者已知。可使用以下方程來計算特定基因座之 PIC：
$$PIC=1-\sum_{i=1}^n p_i^2-2\left[\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2\right]$$
，其中  $p_i$  係第  $i$  個等位基因之頻率，且  $n$  係等位基因之數目。在一些實施例中，高度多型性基因座之 PIC 值係約 0.5 或更大。在一些實施例中，高度多型性基因座之 PIC 值係約 0.5 至約 0.7。在一些實施例中，使用本文所述方法來擴增兩個或更多個高度多型性基因座，而在其他實施例中，使用該等方法來擴增多型性 (PIC < 0.4) 基因座與高度多型性 (PIC  $\geq$  0.5) 基因座之混合物。

本文所述一些實施例中之方法提供核酸試樣中 6 個或更多個多型性基因座之實質上同時之快速聚合酶鏈反應 (PCR) 擴增，其中一些基因座可具有高度多型性，該等基因座全部將藉由雷射誘導之螢光檢測。在一些實施例中，擴增最多 35 個或更多個多型性基因座。本發明多重體中的一些基因座可不具有高度多型性。例如，用於物理性狀、

疾病之基因座、與地域種族性(geoethnicity)有關之基因座或出於常見用途包括之基因座可以最低多型性存在。在該實例之多重體中，牙釉蛋白基因座不具有高度多型性。本文所用術語「實質上同時」係指立即或接近立即及時連續。

所述方法提供STR基因座之快速擴增。在一些實施例中，本文所述方法提供在約45分鐘或更短或約20分鐘或更短時間內自由至少0.006 ng人類基因組DNA構成之試樣快速PCR擴增多型性基因座。在其他實施例中，在約100分鐘或更短時間內擴增多個多型性基因座。在其他實施例中，在以下時間內擴增多個多型性基因座：約80分鐘或更短、約70分鐘或更短、約60分鐘或更短、約50分鐘或更短、約40分鐘或更短、約30分鐘或更短或約20分鐘或更短。在其他實施例中，在約1分鐘至約10分鐘內擴增多個STR基因座。

在一些實施例中，可自靶核酸基因座之至少一個拷貝擴增多個多型性基因座。例如，在多重擴增反應之前，所欲分析試樣(或核酸模板)可包含靶核酸之小於10,000個拷貝、小於1000個拷貝、小於400個拷貝、小於200個拷貝、小於100個拷貝、小於50個拷貝、小於30個拷貝、小於10個拷貝、小於6個拷貝或至少1個拷貝。另外，若靶核酸基因座中之一者以一個拷貝存在於基因組中，或靶核酸基因座以一個以上拷貝存在於基因組中，則可利用小於單一基因組當量之DNA進行擴增。在一些實施例中，根據本文所

述方法之一些實施例，可在試樣中在每一靶核酸內同時擴增至至少兩個基因座且最多約250個基因座。在一些實施例中，同時擴增約26個或27個多型性(或高度多型性)基因座。在其他實施例中，可同時自一或多個靶核酸擴增至至少兩個基因座且最多約250個基因座，其中每一靶核苷酸係自不同源或相同源獲得。

本文所用靶核酸可為任何核酸，例如人類核酸、細菌核酸或病毒核酸。靶核酸試樣可為例如來自以下之核酸試樣：一或多種細胞、組織或體液，例如血液、尿、精液、淋巴液、腦脊髓液或羊水；或其他生物試樣，例如組織培養細胞、頬拭子、漱口水、糞便、組織切片、活體組織切片抽吸物(biopsy aspiration)；及考古學試樣，例如骨或木乃伊化組織。靶核酸可為例如DNA、RNA，或RNA經反轉錄之DNA產物。靶試樣可源自任何來源，包括(但不限於)真核生物、植物、動物、脊椎動物、魚、哺乳動物、人類、非人類、細菌、微生物、病毒、生物來源、血清、血漿、血液、尿、精液、淋巴液、腦脊髓液、羊水、活體組織切片、針吸活體組織切片、癌、腫瘤、組織、細胞、細胞溶解物、粗製細胞溶解物、組織溶解物、組織培養細胞、頬拭子、漱口水、糞便、木乃伊化組織、法醫來源、屍體解剖、考古學來源、感染、醫院內感染、產生來源、藥物製劑、生物分子產品、蛋白質製劑、脂質製劑、碳水化合物製劑、無生命物體、空氣、土壤、汁液、金屬、化石、挖掘材料及/或其他地球或地球外材料及來源。試樣

亦可含有一個來源或不同來源之材料之混合物。例如，當使用所揭示方法擴增受細菌或病毒感染之細胞或組織之核酸時，該細菌或病毒之核酸可連同人類核酸一起擴增。有用靶試樣之類型包括真核試樣、植物試樣、動物試樣、脊椎動物試樣、魚試樣、哺乳動物試樣、人類試樣、非人類試樣、細菌試樣、微生物試樣、病毒試樣、生物試樣、血清試樣、血漿試樣、血液試樣、尿試樣、精液試樣、淋巴液試樣、腦脊髓液試樣、羊水試樣、活體組織切片試樣、針吸活體組織切片試樣、癌試樣、腫瘤試樣、組織試樣、細胞試樣、細胞溶解物試樣、粗製細胞溶解物試樣、組織溶解物試樣、組織培養細胞試樣、頬拭子試樣、漱口水試樣、糞便試樣、木乃伊化組織試樣、屍體解剖試樣、考古學試樣、感染試樣、醫院內感染試樣、產生試樣、藥物製劑試樣、生物分子產生試樣、蛋白質製劑試樣、脂質製劑試樣、碳水化合物製劑試樣、無生命物體試樣、空氣試樣、土壤試樣、汁液試樣、金屬試樣、化石試樣、挖掘材料試樣及/或其他地球或地球外試樣。法醫學試樣之類型包括血液、乾燥血液、血跡、頬拭子、指紋、接觸試樣(例如留在玻璃杯沿、棒球帽之內緣或菸蒂上之上皮細胞)、雷射切開之細胞、口香糖、胃內容物、唾液、指甲刮出物(nail scrapings)、土壤、性侵試樣(包括精液及陰道上皮細胞)、頭髮、骨、皮膚及固體組織。環境試樣之類型包括未經過濾及經過濾之空氣及水、土壤、表面之拭子試樣、封皮及粉末。

例如，在一些實施例中，本文所述方法可提供經擴增核酸試樣，其分析產生適於法醫解釋之數據且特定而言，滿足法醫解釋導則之數據。此等導則包括信號強度、基因座間峰高平衡、異型接合峰高比(PHR)、不完全非模板核苷酸添加(iNTA)及殘跡(stutter) (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Short Tandem Repeat (STR) Interpretation Guidelines. Forensic Science Communications, 2000, 2(3))。

本文所用術語「核酸」意欲涵蓋單鏈及雙鏈DNA及RNA，以及任何及所有形式之含有經修飾鹼基、糖及骨架之替代核酸。因此，應理解，術語「核酸」包括(但不限於)單鏈或雙鏈DNA或RNA(及其可為部分單鏈或部分雙鏈之形式)、cDNA、適體、肽核酸(「PNA」)、2'-5' DNA(縮短骨架之合成材料，該骨架具有匹配DNA之A構象之鹼基間隔；2'-5' DNA通常不會與呈B形式之DNA雜交，但其將容易與RNA雜交)及鎖核酸(「LNA」)。核酸類似物包括天然核苷酸之具有相似或改良結合、雜交或鹼基配對性質之已知類似物。嘌呤及嘧啶之「類似」形式為業內所熟知，且包括(但不限於)氮丙啶基胞嘧啶、4-乙醯基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基尿嘧啶、肌苷、N<sup>6</sup>-異戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鳥嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N<sup>sup.6</sup>-甲基腺

嘧啶、7-甲基鳥嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基Q核苷(mannosylqueosine)、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N<sup>6</sup>-異戊烯基腺嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸及2,6-二氨基嘧啶。由本發明提供之DNA骨架類似物包括磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、氨基膦酸酯、烷基膦酸三酯、氨基磺酸酯、3'-硫縮醛、亞甲基(甲基亞胺基)、3'-N-氨基甲酸酯、嗎啉基氨基甲酸酯及肽核酸(PNA)、甲基膦酸酯連接或交替性甲基膦酸酯及磷酸二酯連接(Strauss-Soukup, 1997, Biochemistry 36:8692-8698)及苯甲基膦酸酯連接，如美國專利第6,664,057號中所論述；亦參見 OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES, A PRACTICAL APPROACH，由F. Eckstein編輯，IRL Press at Oxford University Press (1991)；Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences，第600卷，編輯Baserga及Denhardt (NYAS 1992)；Milligan, 1993, J. Med. Chem. 36:1923-1937；Antisense Research and Applications (1993, CRC Press)。本文中之核酸可根據彼等熟習此項技術者已知之任何手段自細胞提取或以合成方式製備；例如，核酸可經化學合成或自cDNA或mRNA以及其他源轉錄或反轉錄。

在某些態樣中，本文闡述經由快速聚合酶鏈反應(PCR)

實質上同時擴增一或多個靶核酸中之多個核酸基因座之方法。在一些實施例中，此等方法包含(a)在一種溶液中使自一或多個源獲得之一或多個核酸模板之試樣與至少6個不同引子對接觸，每對與一或多個核酸模板中至少6個基因座中之一者雜交，其中標記該引子對中之至少一個引子，且其中使用至少6種不同標記；(b)在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增一或多種核酸中之至少6個多型性基因座以產生至少6種核酸產物。試樣可具有一或多個自單一個體或自一個以上個體獲得(分離或獲得)之核酸。該一或多種核酸亦可自多個源獲得，例如，自兩個或更多個個體或自兩個或更多個來自相同個體之不同組織試樣(例如，器官、細胞類型)獲得。反應室可具有一或多種核酸之一個試樣、或一或多種核酸之一個以上試樣。例如，可使用本文所述方法來對相同核酸試樣或多個核酸試樣運行多個實質上同時之分析(擴增)。

PCR擴增用引子係經特別設計以與靶DNA之基因座雜交的寡核苷酸序列。該等引子用作聚合酶延伸之起始點。為促進對擴增(核酸)片段之分析，亦可在PCR反應中使用經標記引子。經標記引子係偶合(或偶聯)至可檢測部分之寡核苷酸序列；其非限制性實例包括螢光染料、放射性標記及可鑑別金屬核酸序列及蛋白質。在利用螢光標記之引子實施PCR時，產生具有螢光標記之擴增子(核酸擴增產物)。在一些實施例中，在單一擴增反應中(在一個反應室中)使用至少6種、至少7種或至少8種或更多種螢光染料。

可使用一或多種染料來產生對照序列，例如定大小標準或等位基因分型標準物。

引子集合可係為彼等熟習擴增靶核酸中之多個個別基因座之技術者已知之任一者，如上文所述。例如，用於擴增人類核酸試樣中之一或多個基因座之引子闡述以下專利中：美國專利第5,582,989號、美國專利第5,843,660號、美國專利第6,221,598號、美國專利第6,479,235號、美國專利第6,531,282號及美國專利第7,008,771號；及美國專利申請案第2003/0180724號、第2003/0186272號及第2004/0137504號，其每一者以引用方式併入本文中。

此外，用於擴增病毒核酸試樣中之一或多個基因座之引子闡述於(例如)以下專利中：美國專利第7,312,036號、美國專利第6,958,210號、美國專利第6,849,407號、美國專利第6,790,952號及美國專利第6,472,155號，其每一者以引用方式併入本文中。

用於擴增細菌核酸試樣中之一或多個基因座之引子的實例闡述於以下專利中：美國專利第7,326,779號、美國專利第7,205,111號、美國專利第7,074,599號、美國專利第7,074,598號、美國專利第6,664,080號及美國專利第5,994,066號，該等專利中之每一者均以引用方式併入本文中。

鹽及緩衝液包括熟習此項技術者所熟悉者，包括各別包含 $MgCl_2$ 以及Tris-HCl及KCl者。緩衝液可含有添加劑，例如表面活性劑、二甲基亞砜(DMSO)、甘油、牛血清白蛋

白(BSA)及聚乙二醇(PEG)，以及彼等熟習此項技術者所熟悉之其他添加劑。核苷酸通常係去氧核糖核苷三磷酸，例如去氧腺苷三磷酸(dATP)、去氧胞苷三磷酸(dCTP)、去氧鳥苷三磷酸(dGTP)及去氧胸苷三磷酸(dTTP)，亦以足夠量添加至反應室中用於靶核酸擴增。

可視情況將溶液加熱至第一溫度且在該溫度下保持適於熱啟動活化核酸聚合酶之第一時段。通常，第一時段小於約90秒。第一溫度可係約90 - 98°C。可在60秒或更短時間內活化之具有熱啟動機制之聚合酶包括彼等利用抗體介導之熱啟動及適體調介之熱啟動機制者。或者，在本文所述方法中無需利用熱啟動聚合酶。

隨後，反應溶液之溫度可依序在變性狀態、退火狀態與延伸狀態之間循環預定循環次數。在一些實施例中，以下列第一冷卻速率將一種或複數種反應溶液自變性狀態冷卻至退火狀態：約1°C/sec至約150°C/sec或約1°C/sec至約100°C/sec；或約1°C/sec至約80°C/sec；或約1°C/sec至約60°C/sec；或約1°C/sec至約40°C/sec；或約1°C/sec至約30°C/sec；或約1°C/sec至約20°C/sec；約4°C/sec至約150°C/sec或約4°C/sec至約100°C/sec；或約4°C/sec至約80°C/sec；或約4°C/sec至約60°C/sec；或約4°C/sec至約40°C/sec；或約4°C/sec至約30°C/sec；或約4°C/sec至約20°C/sec；或約10°C/sec至約150°C/sec；或約10°C/sec至約100°C/sec；或約10°C/sec至約80°C/sec；或約10°C/sec至約60°C/sec；或約10°C/sec至約40°C/sec；或約10°C/sec至約

30°C/sec；或約10°C/sec至約20°C/sec。可以下列第一加熱速率將一種或複數種反應溶液自退火狀態加熱至延伸狀態：約1°C/sec至約150°C/sec或約1°C/sec至約100°C/sec；或約1°C/sec至約80°C/sec；或約1°C/sec至約60°C/sec；或約1°C/sec至約40°C/sec；約1°C/sec至約30°C/sec；約1°C/sec至約20°C/sec；4°C/sec至約150°C/sec,或約4°C/sec至約100°C/sec；或約4°C/sec至約80°C/sec；或約4°C/sec至約60°C/sec；或約4°C/sec至約40°C/sec；約4°C/sec至約30°C/sec；約4°C/sec至約20°C/sec；或約10°C/sec至約150°C/sec；或約10°C/sec至約100°C/sec；或約10°C/sec至約80°C/sec；或約10°C/sec至約60°C/sec；或約10°C/sec至約40°C/sec；或約10°C/sec至約30°C/sec；或約10°C/sec至約20°C/sec；及/或以下列第二加熱速率將一種或複數種反應溶液自延伸狀態°C/sec加熱至變性狀態：約1°C/sec至約150°C/sec或約1°C/sec至約100°C/sec；或約1°C/sec至約80°C/sec；或約1°C/sec至約60°C/sec；或約1°C/sec至約40°C/sec；約1°C/sec至約30°C/sec；約1°C/sec至約20°C/sec；約4°C/sec至約150°C/sec或約4°C/sec至約100°C/sec；或約4°C/sec至約80°C/sec；或約4°C/sec至約60°C/sec；或約4°C/sec至約40°C/sec；約4°C/sec至約30°C/sec；約4°C/sec至約20°C/sec；或約10°C/sec至約150°C/sec；或約10°C/sec至約100°C/sec；或約10°C/sec至約80°C/sec；或約10°C/sec至約60°C/sec；或約10°C/sec至約40°C/sec；或約10°C/sec至約30°C/sec；或約10°C/sec至

約 20°C/sec。最終，使反應溶液保持在最終狀態下以提供一種或複數種經擴增核酸產物。

退火溫度及時間可影響引子與靶核酸內特定基因座結合之特異性及效率且對於多重PCR反應而言可能至關重要。完整引子對集合在退火步驟期間之正確結合可允許產生複數個基因座之多重擴增，例如，一種或複數種具有可接受PHR及基因座間信號強度平衡之完全STR圖譜。對於給定引子對而言，在一些實施例中，退火狀態可在約50°C至70°C範圍內且時間在小於1秒至大於30秒範圍內。實際時間及溫度取決於酶、引子及靶。

延伸溫度及時間可影響等位基因產物產率且應理解為所用酶之固有性質。對於給定酶而言，在一些實施例中，延伸狀態可在約45°C至80°C範圍內且時間在約小於1至大於30秒範圍內。實際時間及溫度取決於酶、引子及靶。為持續預定循環次數，可以下列第3速率將反應溶液自延伸狀態加熱至變性狀態：約1°C/sec至約150°C/sec或約1°C/sec至約100°C/sec；或約1°C/sec至約80°C/sec；或約1°C/sec至約60°C/sec；或約1°C/sec至約40°C/sec；或約1°C/sec至約30°C/sec；或約1°C/sec至約20°C/sec；4°C/sec至約150°C/sec或約4°C/sec至約100°C/sec；或約4°C/sec至約80°C/sec；或約4°C/sec至約60°C/sec；或約4°C/sec至約40°C/sec；或約4°C/sec至約30°C/sec；或約4°C/sec至約20°C/sec；或約10°C/sec至約150°C/sec；或約10°C/sec至約100°C/sec；或約10°C/sec至約80°C/sec；或約10°C/sec至約

60°C/sec；或約10°C/sec至約40°C/sec；或約10°C/sec至約30°C/sec；或約10°C/sec至約20°C/sec。在一些實施例中，預定循環次數選擇為約10次至約50次循環，但可視需要使用較少或較多次循環。

對於STR反應而言，可顯著縮短最終延伸時間直到不完全NTA開始增加。對於給定酶而言，在一些實施例中，最終延伸溫度可在約60°C至75°C範圍內且時間在約0至5400秒範圍內。實際時間及溫度取決於酶、引子及靶。

除上述3-步驟熱循環方法外，本發明之此方法及組合物亦適於2-步驟熱循環方法。在此方法中，在一些實施例中，反應溶液依序在變性狀態與退火/延伸狀態之間循環預定循環次數。此方法可利用設計用於在延伸溫度下退火之引子，從而允許退火及延伸步驟共享相同溫度。減少溫度轉變次數可進一步縮短循環時間。

在一些實施例中，在約5分鐘至約20分鐘內獲得多種經擴增核酸產物。在某些其他實施例中，在約5分鐘至10分鐘、約1分鐘至5分鐘或小於5分鐘內獲得多種經擴增核酸產物。在一些實施例中，可自小於約10 ng之靶核酸開始產生每一經擴增核酸產物。在一些實施例中，自小於約5 ng或小於約2 ng之核酸、或小於約1 ng之核酸、或小於約0.5 ng之核酸、或小於約0.2 ng之核酸、或小於約0.1 ng之核酸、或小於約0.05 ng之核酸、或小於約0.006 ng之核酸開始產生經擴增核酸產物。

在其他實施例中，例如在臨床或環境試樣中鑒定生物武

器試劑或在人類、植物及動物中診斷細菌、病毒或真菌感染，可自靶核酸之至少一個拷貝開始產生經擴增核酸產物。例如，在多重擴增反應之前，所欲分析試樣可包含靶核酸之小於1000個拷貝(例如，1-1000個拷貝)、小於400個拷貝、小於200個拷貝、小於100個拷貝、小於50個拷貝、小於30個拷貝、小於10個拷貝或1個拷貝。

在前述方法中之任一者中，熱循環可實施預定循環次數以達成靶核酸中之基因座之足夠擴增，如熟習此項技術者所容易確定。例如，預定循環次數可在介於約10次與約50次循環之間之範圍內，且在一些實施例中在約20次與50次循環之間之範圍內。此外，在前述方法中之至少一些實施例中，可實質上同時擴增一種或複數種核酸之至少2個基因座。端視期望應用而定，可同時擴增大於4個、5個至10個、10個至20個、20個至30個或約10個至250個基因座。例如，對於STR基因座之擴增而言，可擴增10-20個基因座。

許多市售聚合酶可適用於使用本文所述方法之快速PCR應用。在一些實施例中，核酸聚合酶具有至少100個鹼基/sec之延伸速率。大量可用於PCR擴增之聚合酶包括水生棲熱菌(Taq)、強烈火球菌(Pfu)、伍斯氏火球菌(Pwo)、黃棲熱菌(Tfl)、嗜熱棲熱菌(Tth)、利托氏棲熱菌(Tli)及海棲熱袍菌(Tma)。該等酶、該等酶之經修飾形式及酶之組合可購自供應商，包括Roche、Invitrogen、Qiagen、Stratagene及Applied Biosystems。代表性酶包括PHUSION (New

England Biolabs, Ipswich, Mass.)、Hot MasterTaq.TM. (Eppendorf)、PHUSION Mpx (Finnzymes)、PyroStart (Fermentas)、KOD (EMD Biosciences)、Z-Taq (TAKARA) 及 CS3AC/LA (KlenTaq, University City, Mo.)。廣泛用於 STR分型之PCR擴增之酶係Taq DNA聚合酶。

大量染料(大於100種)可應用於螢光激發及檢測。可用染料之寬範圍允許選擇發射波長遍佈檢測範圍且因此在最大發射之間具有最小重疊之染料集合。經化學修飾用於共價連接至寡核苷酸及引子之可用染料包括彼等來自以下者：螢光素、玫瑰紅(rhodamine)、AlexaFluor、氟硼螢(Bodipy)、香豆素、級聯(Cascade Dye)及青色素染料家族。螢光染料可購自諸多商業供應商，包括 Invitrogen/Molecular Probes (Carlsbad, CA)、Anaspec (Freemont, CA)、GE Healthcare (Piscataway, NJ)及Pierce/Thermo Fisher (Waltham, MA)，此等染料可以經化學修飾之衍生物(例如亞醯胺化物(amidite)、N-羥基琥珀醯亞胺酯、琥珀酸亞胺酯、異硫氰酸酯)獲得以用於連接至寡核苷酸。諸多公司提供此等經螢光標記之寡核苷酸及經化學修飾之寡核苷酸之合成(例如 Invitrogen, Carlsbad, CA, Operon Biotechnologies, Huntsville, Alabama；IDT, Coralville, IA；Gene Link, Hawthorne, NY；AnaSpec公司，Freemont, CA；BioSynthesis, Lewisville, TX)。

經化學活化(修飾)之螢光染料可在寡核苷酸合成期間(亞醯胺化物化學，PhAm chemistry)或在合成後(經NHS酯、

琥珀酸亞胺酯或異硫氰酸酯修飾之染料) 附接至寡核苷酸探針/引子。儘管第一方法(將亞磷醯胺連接之染料基團納入生長寡鏈中)較便利，但已充分建立活化染料(例如，呈NHS酯形式)與含有5'胺基連接基團之寡核苷酸之合成後偶合。胺基藉此與活化染料反應，從而形成在PCR、雜交及其他操作期間穩定之共價鍵。亞磷醯胺連接之染料之實例係FAM、JOE及一些Cy染料。

螢光染料之峰激發波長通常自其峰發射波長藍移20 nm至50 nm (斯托克斯位移(Stokes shift))。因此，在寬範圍之發射波長內使用染料可需要使用多個激發源，其中激發波長用於達成染料在發射波長範圍內之有效激發。例如，使用習用藍色氬雷射(最大激發在488 nm下)在488 nm下極有效地激發FAM，而相同雷射(Cy5.5最大激發係在673 nm下)極無效地激發Cy5.5。一種有效激發此等紅移染料之方法係藉由能夠有效單雷射激發(例如) FAM及Cy5.5之螢光能量轉移。此可藉由將由所選光源有效激發之染料(吸收器)緊密靠近不會受到相同光源有效激發但在紅移波長下發射之染料(發射器)連接來達成。緊密靠近發射器放置吸收器允許所吸收能量自吸收器轉移至發射器，從而允許更有效地激發長波長染料。吸收器與發射器之最佳空間距離稱為Förster距離且係藉由將適宜間隔部分置於吸收器與發射器染料之間以實驗方式確定。此等部分可係簡單碳間隔體(例如C3、C6、C18連接體)、寡核苷酸間隔體或經修飾核苷酸，兩種染料可與該等部分化學連接以維持最佳距離。

吸收器與發射器染料之最佳間隔將導致吸收器之激發、能量轉移至發射器及僅發射器染料之螢光發射。若染料間隔過開，則螢光能量轉移效率較低且吸收器可在其最大螢光波長下發射。相反，若吸收器及發射器間隔過密，則可觀察到螢光淬滅(無螢光/發射)。

最終，染料可改變擴增片段之電泳移動率。一般而言，除非經改變移動率引起與不同基因座之擴增子之重疊，否則此並非重要問題。在此經改變移動率會引起重疊之相對不常見事件中，需要消除重疊之引子設計(例如藉由將鹼基添加至基因座之經標記引子之5'末端，以產生重疊基因座之較大擴增子)。

可使用彼等熟習此項技術者已知之若干參數來最佳化本文所述PCR擴增方法。最佳化該等方案之標準包括產生全部圖譜、信號強度、動態範圍、基因座間信號強度平衡、PHR、不完全NTA、殘跡及總循環時間(Hill, CR, Butler, JM, Vallone, PM. A 26plex Autosomal STR Assay to Aid Human Identity Testing. J Forensic Sci 54: 1008-1015. 2009. Brownstein, MJ, Carpten, JD, Smith, JR. Modulation of Non-Template Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping. BioTechniques 30:1004-1010. 1996. SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories. 2010. <http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/swgdam->

interpretation-guidelines)。

在一些實施例中，至少10次、20次或30次多重PCR循環之總循環時間可在約1分鐘至約90分鐘範圍內。在一些實施例中，至少10次、20次或30次多重PCR循環之總循環時間在以下範圍內：約1分鐘至約90分鐘；或約1分鐘至約85分鐘；或約1分鐘至約80分鐘或約1分鐘至約75分鐘；或約1分鐘至約70分鐘；或約1分鐘至約65分鐘；或約1分鐘至約60分鐘；或約1分鐘至約55分鐘；或約1分鐘至約50分鐘；或約1分鐘至約45分鐘；或約1分鐘至約40分鐘；或約1分鐘至約35分鐘；或約1分鐘至約30分鐘；或約1分鐘至約25分鐘；或約1分鐘至約20分鐘；或約1分鐘至約15分鐘；或約1分鐘至約10分鐘或約1分鐘至約5分鐘。在其他實施例中，至少10分鐘、20分鐘或30分鐘多重PCR循環之總循環時間小於約90分鐘。在其他實施例中，至少10次、20次或30次多重PCR循環之總循環時間小於約89分鐘、85分鐘、80分鐘、75分鐘、70分鐘、65分鐘、60分鐘、55分鐘、50分鐘、45分鐘、40分鐘、35分鐘、30分鐘、25分鐘、20分鐘、15分鐘、10分鐘、5分鐘、4分鐘、3分鐘、2分鐘或1分鐘。

涵蓋本文所述方法可使用諸如 GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 等習用 PCR 熱循環器實施。每一反應室可含於薄壁反應管內。薄壁反應管之壁厚度較佳小於約 200  $\mu\text{m}$ 。較佳地，薄壁反應管之壁厚度較佳小於約 100  $\mu\text{m}$ 。

亦涵蓋本文中之PCR擴增方法係使用微流體生物晶片實施，例如彼等以下申請案中所述者：標題為「Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids」之申請案第12/080,746號及標題為「Unitary Biochips」之申請案第13/044,485號，此二者均已以引用方式併入本文中。每一反應室可含於生物晶片(例如，微流體生物晶片)內。

在一些實施例中，可使用生物晶片來實施本發明方法。某些生物晶片設計可達成微流體領域之基本目標：在複雜過程中整合一些或在一些實施例中所有步驟、自試樣之插入至結果之產生、在單一儀器中實施而無操作者介入。在一些實施例中，生物晶片可經完全整合且能夠實施複雜的試樣入-結果出分析，包括細胞裂解、DNA純化、多重擴增以及電泳分離及檢測，以自法醫試樣產生短串聯重複序列(STR)圖譜；細胞裂解、DNA純化、多重擴增、Sanger定序、超濾以及電泳分離及檢測，以自臨床試樣產生DNA序列；核酸純化、反轉錄、多重擴增、Sanger定序、超濾以及電泳分離及檢測，以自生物威脅試樣產生DNA序列；及核酸純化、文庫構築及單分子定序，以自人類、細菌及病毒臨床及研究試樣產生基因組DNA序列。

在一些實施例中，試樣操作係在生物晶片中實施，包括核酸提取之組合；細胞裂解；細胞分離；差別細胞裂解；差別過濾；總核酸純化；DNA純化；RNA純化；mRNA純化；蛋白質純化；核酸擴增前淨化；核酸擴增(例如單重

及多重端點PCR、即時PCR、反轉錄PCR、不對稱PCR、巢式PCR、LATE PCR、降落式PCR、數位PCR、滾環式擴增、鏈替代擴增及多重置換擴增)；Y-STR擴增；微型-STR擴增；單核苷酸多型性分析；VNTR分析；RFLP分析；核酸擴增後淨化；核酸定序前淨化；核酸定序(例如Sanger定序、焦磷酸定序及單分子定序)；核酸定序後淨化；反轉錄；反轉錄前淨化；反轉錄後淨化；核酸連結；SNP分析；核酸雜交；電泳分離及檢測；免疫分析；結合分析；蛋白質分析；酶促分析；質譜術；及核酸及蛋白質量化。

在一些實施例中，生物晶片允許純化、操作並分析來自未經處理生物試樣之核酸及其他生物組份。未經處理生物試樣係彼等由個體收集且隨後插入生物晶片之不具有中間處理步驟之試樣接收室中者(但試樣收集器件在處理前可經標記及/或儲存)。操作者僅需收集或以其他方式獲得試樣，將該試樣插入裝置中，將該裝置插入儀器中(若預先將該裝置置於該儀器中，則無需此步驟)，並按壓啟動按鈕。在插入裝置中之前無需處理、操作或修飾試樣，操作者不必切割拭子，打開採血管，收集組織或生物流體，將試樣轉移至另一支持器，或將試樣暴露於試劑或條件(例如熱、冷、振動)。因此，操作者無需在生物科學或實驗室技術方面具有廣泛訓練。視情況，生物晶片可接受經處理生物試樣(例如供隨後純化之細胞溶解物)，但此等應用可需要具有技術訓練之操作者。

實際上，生物試樣係使用大量收集器件收集，該等器件

均可與本文所述方法一起使用。收集器件通常可自市面購得，但亦可經特定設計並製造用於給定應用。對於臨床試樣而言，可獲得多種商業拭子類型，包括鼻、鼻咽、頰、口腔液、糞便、扁桃體、陰道、子宮頸及傷口拭子。試樣收集器件之尺寸及材料有所不同，且器件可含有專門手柄、蓋、用以促進並引導破裂之刻痕及收集基質。將血液試樣收集於多種不同容積之市售管中，該等管中之一些含有添加劑(包括抗凝血劑，例如肝素、檸檬酯鹽及EDTA)、促進試樣進入之真空、促進針插入之塞子及保護操作者免於暴露於試樣之覆蓋物。亦將組織及體液(例如痰、膿性材料、抽吸物)收集於通常與采血管不同之管中。通常將該等臨床試樣收集器件發送至高級醫院或商業臨床實驗室以供測試(但可在照護點實施某些測試，例如評估喉/扁桃體拭子以供快速鏈球菌測試)。環境試樣可以下列形式存在：過濾器或濾筒(例如來自吸氣裝置、氣溶膠或水過濾器)、拭子、粉末或流體。

常見法醫證據收集技術係使用拭子實施。拭子可購自Bode (Lorton, VA)、Puritan (Guilford, ME), Fitzco (Spring Park, MN)、Boca (Coral Springs, FL)、Copan (Murrieta, CA)及Starplex (Etobicoke, ON, Canada)。亦可使用紗樣材料、可棄式刷子或市售生物取樣套組實施擦拭。法醫試樣可含有血液、精液、上皮細胞、尿、唾液、糞便、各種組織及骨。經常使用頰拭子收集來自在現場個體之生物證據。廣泛使用之商業頰拭子係SecurSwab (The Bode

Technology Group, Lorton, VA)。頰試樣係藉由指示個體或操作者將拭子置於口內面頰內表面上並上下移動拭子一或多次來收集。

在一些實施例中，在本文所述方法中使用生物晶片以對多個平行試樣實施複雜過程。在一些實施例中，使用相同操作集合處理多個試樣或使用經調整操作集合處理每一試樣(或試樣子集合)。在一些實施例中，對給定試樣實施7個獨立分析。例如，可藉由分離DNA且隨後對純化材料實施STR分析、SNP分析及粒線體定序來分析法醫試樣。類似地，可藉由純化核酸及蛋白質並實施PCR、反轉錄PCR、DNA定序及免疫分析來分析臨床試樣，從而允許(例如)在單一生物晶片上同時針對大量病原體及細胞過程詢問給定試樣。

可向生物晶片操作及數據分析提供一系列軟體及韌體。儀器硬體係藉由支配組件功能並實施儀器自我測試之軟體及韌體來控制。自動化腳本控制儀器與生物晶片之所有相互作用，包括施加所有腳本化過程步驟。分析軟體實施原始數據之處理(例如電泳圖之色彩校正)與分析結果(例如片段定大小、STR等位基因調用、DNA序列分析)二者。儀器可含有圖形化使用者介面，該介面允許使用者起始過程並告知使用者過程狀態。最終，系統可儲存相關分析比較物(例如來自所關注個體之STR圖譜或病原體之DNA序列)，或系統可輸出結果用於外部數據庫匹配及進一步分析。

以下實例係用於說明本發明具體實施例及其各種用途。

其僅出於解釋目的來陳述，且不視為限制本發明。

實例

實例 1

在 5 色彩擴增及分離及檢測系統中對同時多重擴增之 STR 基因座 D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA 及 SE33 及牙釉蛋白基因座之螢光檢測。

此多重設計中之第一步驟需要選擇基因座。使用若干標準自幾十萬可用多型性基因座進行選擇，但主要辨別因素係每一基因座之多型性程度。具有較多展示較相似頻率之等位基因之基因座展示較高異型接合度

( $H=1-\sum_{i=1}^n P_i^2$ ) (Weir, BS. Genetic Data Analysis II, 第 4 章, 第 141 頁。Sinaeur Associates 公司, Publishers 1996) 及較高多型性資訊含量 ( $PIC=1-\sum_{i=1}^n p_i^2-\sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$ , Botstein, D, White, RL, Skolnick, M, Davis, RW. Construction of a genetic Linkage Map in Manu Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, Am J Hum Genet 32: 314-331, 1980)。此性狀在使 DNA 試樣源彼此匹配方面提供顯著優點。個別基因座之高度多型性資訊含量在包括有關個體之親子及親屬關係分析中尤其重要，此乃因基因組僅可適應有限數目之對於該等分析較佳之未連鎖基因座。因此，一般而言，除非

其他因素影響選擇，否則選擇具有許多等位基因之高度多型性基因座。

另一重要因素係在美國及全世界納入用於法律執行目的之基因座。並非所有國家使用相同STR基因座集合用於鑒定。不同國家使用不同基因座集合之事實會降低用在一國收集之圖譜搜索另一國之數據庫的實用性。藉由產生包括所有美國標準STR基因座以及所有常規地用於全世界管轄區之基因座的引子集合，搜索數據庫並鑒定個體之資訊量將大得多。此方法在移民測試及與國際犯罪有關之試樣之測試方面提供額外使用優點，此乃因多重體含有用於搜索全世界數據庫之適宜基因座。

設計含有25個STR基因座及牙釉蛋白基因座之多重體，如表3中所示。此多重體包括美國CODIS數據庫中接受之所有13個STR基因座(表3，美國CODIS欄)及彼等針對歐洲國家中之標準化所推薦者[Schneider, PM. Expansion of the European Standard Set of DNA Database Loci-The Current Situation. Profiles in DNA, Promega公司，2009年3月。  
<http://www.promega.com/resources/articles/profiles-in-dna/2009/expansion-of-the-european-standard-set/>]，European DNA Profiling (EDNAP) Group及European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)(表3，歐洲EDNAP/ENFSI欄)。奧地利國家數據庫集合中包括3個不同基因座且德國數據庫中包括一個不同基因座SE33。最終，亦包括五核苷酸基因座，其用於評價在經擴增等位基因之間觀察

到之增加之分離。

表3. 基因座選擇

	CODIS核心 13個STR基 因座	歐洲EDNAP/ENFSI 標準STR集合	奧地利 德國	本發明之 26-基因座 實例
1		牙釉蛋白		牙釉蛋白
2	CSF1PO			CSF1PO
3		D1S1656		D1S1656
4		D2S441		D2S441
5			D2S1338 (奧地利)	D2S1338
6	D3S1358	D3S1358		D3S1358
7	D5S818			D5S818
8	D7S820			D7S820
9	D8S1179	D8S1179		D8S1179
10		D10S1248		D10S1248
11		D12S391		D12S391
12	D13S317			D13S317
13	D16S539		D16S539 (奧地利)	D16S539
14	D18S51	D18S51		D18S51
15			D19S433 (奧地利)	D19S433
16	D21S11	D21S11		D21S11
17		D22S1045		D22S1045 (不需要)
18	FGA	FGA		FGA
19			SE33 (德國)	SE33 (不需要)

20	TH01	TH01		TH01
21	TPOX			TPOX (不需要)
22	vWA	vWA		vWA
23				Penta B
24				Penta C
25				Penta D
26				Penta E

將STR基因座置於多重體中係基於若干考慮，包括分離系統中可檢測片段之範圍、分離系統之解析度(其可基於兩個欲辨別片段之分子量而變化)及在電泳分離之情形下可在分離期間檢測之螢光染料之數目。25 STR/牙釉蛋白多重體將4個及5個具有相對較少且罕見之微變異等位基因(即，不與其他等位基因相差整數重複長度之等位基因)之鹼基重複基因座置於較大擴增子位置中。此方法提供藉由將較高分子量範圍內之等位基因置於通常具有最低解析度之區域中來最佳化分析該等等位基因(對於給定分離平臺及給定分離時間)之優點。放置額外4個及5個具有在高分子量範圍內之相對較少且罕見之微變異等位基因的重複基因座，同時放置含有3個鹼基重複(即，D22S1045)之高度多型性基因座及展示較高頻率之較低分子量範圍之微變異基因座的基因座係此多重設計重要態樣。相同設計特性允許在所包括基因座之整個範圍內較快速地分離等位基因，此乃因高分子量範圍內之具有5-鹼基分離之等位基因比更常用之4鹼基或3鹼基STR重複更容易分離。此方法允許改

良多重設計之高分子量區域之用途，從而允許納入較多具有高度多型性特性之經染料標記之基因座，且最終允許在多重體中納入較多該等基因座。25個STR基因座及牙釉蛋白基因座經總共4種色彩標記(使用第5種色彩來標記大小標記物)且在74個鹼基至485個鹼基之總分子量範圍內放置。在降解試樣消除一些高分子量資訊之情形下，亦在較大擴增子位點之位置中佈置最不常用基因座以允許資訊損失。

圖1闡釋允許在單一反應中共擴增26個基因座之設計。第1框指示以FAM標記之基因座，包括彼等基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B，第2框展示以JOE標記之基因座，包括彼等基因座TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C，第3框展示以羧基-四甲基玫瑰紅(TMR)標記之基因座，包括彼等基因座D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白、Penta D，且第4框及第5框展示以下基因座之經5,6-羧基玫瑰紅6G (CXR)標記之基因座：D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA及SE33。第6框展示構成經包括用於分析之大小標記物之經CC5標記片段。

構築多重STR集合可能需要消除因混合物中意外引子相互作用產生之偽產物。例如，在聚合酶鏈反應期間，一個基因座之經標記引子可與另一基因座之未經標記引子協同作用以擴增不期望序列。此可發生於基因組靶DNA，但更

可能因反應期間經設計擴增子之濃度增加而發生；此增加會向欲發生之非有意擴增事件提供較高濃度之模板(產生偽產物)。此等偽產物在產生後，與冒犯性(offending)引子對完美匹配且在隨後多輪擴增中有效地擴增。

鑒定兩個在多重體中產生所討論具體偽產物之引子有助於解決此等偽產物。此係藉由自混合物系統地消除個別引子或引子組直至鑒定兩個存在及不存在分別與偽產物之存在及不存在對應的具體引子來達成。在鑒定成因性引子後，可以多種方式消除偽產物。該等方式包括(1)較少地使用引子對中含有冒犯性引子者，(2)藉由將鹼基添加至3'末端或藉由完全重新設計成新結合位點來改變一個或兩個冒犯性引子之序列，(3)將引子對中經標記引子改變成未經標記引子且將未經標記引子改變成經標記引子(由此使偽產物不可檢測)，或(4)改變一或兩對中經標記引子與未經標記引子之比率以減少不期望產物之產生。使用經驗分析來確定達成每一偽產物或偽產物集合之偽產物減少之最有效手段。

基因座-基因座平衡亦係產生法醫學上有用之多重集合之重要屬性。就此而言，初始引子設計包括設計在各別熔化溫度中彼此相似之引子。將擴增過程中所用退火溫度設定於低於此熔化溫度以確保所有引子靶主要處於具有互補引子之雙重狀態而非變性狀態。即使如此，每次循環之相對擴增效率可在不同基因座之間有所不同，從而產生一些基因座之表現大於其他基因座之最終多重擴增產物。一種

克服此不平衡之方式係增加一些引子之濃度，同時降低其他引子之濃度以補償一些影響擴增過程之其他因素。此方法具有侷限，此乃因決不可能將擴增效率改良至每輪擴增增加超過2倍。

將26個STR基因座中每一者之引子序列合併至包括表4中所列示引子序列之單一溶液中。

表4.

實例1 基因座	序列(5'至3')
AMEL	CCCTGGGCTCTGTAAAGAA
AMEL	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG
CSF1PO	CCGGAGGTAAAGGTGTCTTAAAGT
CSF1PO	ATTTCCTGTGTCAGACCCTGTT
D1S1656	GCGCCTGGTCTTTGTTTAT
D1S1656	AGAAAATCCCCATATAAGTTCAAGC
D2S1338	CAAAACCCTGAAAATGGCAATT
D2S1338	AGTGTTTCATGCCTACATCCC
D2S441	CTTCCTCCAGGGTATTAATGGG
D2S441	ACATCACAAAATCTTCACTCTCC
D3S1358	CCCCACTGCAGTCCAATC
D3S1358	AATCAACAGAGGCTTGCATG
D5S818	GGTGATTTTCCTCTTTGGTATCC
D5S818	AGTTTACAACATTTGTATCTTTATCTGTATC
D7S820	ATGTTGGTCAGGCTGACTATG
D7S820	GATTCCACATTTATCCTCATTGAC
D8S1179	GTATTTTCATGTGTACATTCGTATCTATC

D8S1179	GCCTTAATTTATTTACCTATCCTGTAG
D10S1248	AAAGCAAACCTGAGCATTAGC
D10S1248	GTGAGAAACCATACTTTTTCCCT
D12S391	CTGGTGAAGGAAGAAAAGAGAAT
D12S391	TTGGCTTTTAGACCTGGACTGA
D13S317	ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA
D13S317	GGCAGCCCAAAAAGACAGA
D16S539	TCAATACAGACAGACAGACAGGTGGAT
D16S539	GTTTGTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC
D18S51	CACTTCACTCTGAGTGACAAAT
D18S51	TCTGGTGTGTGGAGATGTCTTACAATA
D19S433	GCAAAAAGCTATAATTGTACCACT
D19S433	AGTTCTTTAGCAGTGATTTCTGATATT
D21S11	ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG
D21S11	TGTATTAGTCAATGTTCTCCAGAGAC
D22S1045	ATCGTTGGAATTCCCCAAACTG
D22S1045	GTGACCTCAGGCAAGTCCCTA
FGA	CCATAGGTTTTGAACTCACAGATTAA
FGA	GCCAGCAAAAAGAAAGGAAGA
Penta B	CTTGAAGCTGGGAGACGGAAAGT
Penta B	AGCTCTCTTACTTTGGGTGGGC
Penta C	CTTGCAGGAGACAGGGTTTATA
Penta C	CGCCACTGCTACAAGAGAG
Penta D	GTGAGGCTGAAGTAGGATCAC
Penta D	GACACAAGTCCTTTTTTAGATATGTG
Penta E	GGGCGACTGAGCAAGACTCA
Penta E	GACATTTCTTATTTTCTCATATTGGTGG
SE33	TCTGTAATTCCAGCTCCTAGG

SE33	AGGTTTATATATATTTCTACAACATCTCC
TH01	GGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCC
TH01	GAGTGCAGGTCACAGGGAAC
TPOX	GCACAGAACAGGCACTTAGG
TPOX	CCCCAACGCTCAAACGTGAGGTTG
vWA	TCCAAGTTGACTTGGCTGAG
vWA	CAGATGATAAATACATAGGATGGATG

使用此26-重25-STR溶液，在單一反應器皿中同時於以下個別基因座處擴增人類基因組DNA模板(品系9947)：D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA及SE33。在微流體生物晶片中在7  $\mu$ l反應物中實施PCR擴增。以玻片模式注入模製PCR生物晶片(圖2A)且使用圖2B之快速熱循環器順利地測試快速多重PCR。此生物晶片厚25 mm $\times$ 75 mm $\times$ 1.1 mm。該系統允許自單一基因組當量之人類DNA (6 pg DNA，基本上為單拷貝檢測限)多重擴增STR片段。基本上如以下文獻中所述實施反應：Giese, H., 等人(2009). 「Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis.」 *J Forensic Sci* 54(6): 1287-96。施加31次循環方案以使反應在熱循環室內循環，從而產生經標記擴增子。循環條件如下：熱啟動

93°C × 20 秒，之後 31 次循環 (93°C × 4 秒、56°C × 15 秒及 70°C × 7 秒)，之後 70°C × 90 秒之最終延伸。亦參見標題為「Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids」之申請案第 12/080,746 號及標題為「Unitary Biochips」之申請案第 13/044,485 號，此二者均已以方式併入本文中。使用 NetBio's Genebench-FX 分離並檢測擴增產物，如下文實例 6 中所述。

圖 3 顯示對所得 26-重反應物之每一基因座之擴增產物的色彩校正掃描。使用 26-基因座引子集合來擴增每一基因座之片段，該等片段係利用 NetBio GeneBench FX™ 儀器來分離並檢測。第一框展示以 FAM 標記之峰，包括彼等基因座 D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B 之峰，第二框展示以 JOE 標記之峰，包括彼等基因座 TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C 之峰，第 3 框展示以羧基-四甲基玫瑰紅 (TMR) 標記之峰，包括彼等基因座 D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白、Penta D 之峰，第 4 框及第 5 框展示以下基因座之經 5,6-羧基玫瑰紅 6G (CXR) 標記之峰：D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA 及 SE33。第 6 框展示構成大小標記物之經 CC5 標記之片段。

實例 1 顯示有效共擴增係利用 25 個不同 STR 基因座以及牙釉蛋白基因座達成，且分離並檢測該等產物。此顯示，所用引子序列經足夠充分設計並平衡，以產生 26 個基因座

中每一者之擴增產物，其具有與擴增材料中所觀察到之局部背景雜訊不同之片段。由於擴增材料係來自人類品系9947之已知標準DNA，因此預計片段已知且經驗證。然而，限制至5種染料會使得難以理解一些試樣，此乃因經CXR標記之D8S1179、FGA及SE33等位基因範圍各自與其他6個經CXR標記之基因座中之一或多者顯著重疊。實例2克服此限制，該實例採用6種螢光染料以允許將每一基因座之等位基因在每一個別染料內完全分離成獨特大小範圍。

#### 實例2

25-STR基因座多重體。

實例2展示25個不同人類STR基因座與牙釉蛋白基因座之共擴增，以及共擴增產物分離成不同等位基因大小範圍及其檢測，該等範圍不具有經相同染料標記之相鄰等位基因之重疊。此基因座集合包括完整的13個CODIS基因座、8個額外的歐洲、奧地利及德國標準或經提議標準基因座、4個Penta基因座及允許性別鑒定之牙釉蛋白。此方法允許結合法醫分型方法並在美國與全世界許多國家及組織之間共享較多有用數據。可使用多重體來分析DNA試樣，然後支援在歐洲、美國及全世界之數據庫中進行搜尋，以支援在所有該等管轄地之法律執行、反恐及國土安全努力。

在6色彩擴增及分離及檢測系統中對同時多重擴增之基因座牙釉蛋白、D3S1358、D19S433、D2S1338、

D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA及SE33之螢光檢測。此多重設計實例係由共擴增與實例1中所述相同之基因座之引子構成。其不同之處在於基因座D8S1179、FGA及SE33係利用含有經用於該3個基因座之第6種染料標記之引子代替經ROX標記之如實例1中之引子的引子對來擴增。第6種染料係DyLight 633，但若需要可利用諸多其他染料。除此第6種染料外，此多重體中之其他染料係FAM、JOE、TMR、CXR及CC5。

圖4闡釋在研發本發明多重系統中所採用方法之優點。用於標記各列中特定基因座之染料列示於左欄中(A488代表ATTO488染料)。可自圖之頂部顯示之標度確定各基因座之大約等位基因大小。在多重體中放置若干高度多型性基因座(各呈現許多等位基因在個體群體中)極為合意。然而，在分離期間較高分子量範圍之DNA片段之解析度喪失產生可行擴增子大小範圍之上限，因此限制可明顯分離及分析之經各螢光染料標記之基因座的數目。增加染料數目係一種克服此限制之方式(一種替代方法係增加由電泳系統分離之有效MW範圍)。包括第6種螢光染料偶聯至D8S1179、FGA及SE33基因座之特定引子允許發生共擴增及各別呈現，而不產生重疊等位基因之擴增子，即產生一個基因座之等位基因出現在以相同染料標記之引子之另一

基因座之等位基因之大小範圍內。

換言之，此25-基因座分析係實質上非重疊STR分析。實質上非重疊分析之價值在於其基本上消除以相同方式標記之相鄰基因座之重疊等位基因產生混淆的可能性。僅超出STR基因座大小範圍之罕見等位基因可引起此混淆。實例5之吾等27重分析之設計具有4個此等罕見重疊等位基因，16重ABI Identifiler分析具有至少6個罕見重疊等位基因，及Powerplex 16重分析具有8個此等罕見重疊等位基因。該等罕見等位基因中之大多數已基於一次或幾次出現報導於文獻中。因此，設計多重體以允許評估大量STR基因座同時維持實質上非重疊分析係本發明之主要優點。

除實例I之分析外，各實例中提供之所有STR分析係實質上非重疊的。因此，代表等位基因之片段係藉由大小或色彩或二者可靠地分離以用於可視化及分析。此係可能的，此乃因對於多重體中包括之基因座而言，可獲得許多群體中之實質性群體數據。不採用該等數據時，需要實質上彼此分離等位基因範圍，從而允許每一色彩中展示之較少高度多型性基因座，或在將其緊靠放置時，會產生相同色彩之相鄰基因座之等位基因大小範圍實質性重疊的風險。

在此實例中，在單一反應器皿中同時於以下基因座處擴增DNA模板(品系9947)：經FAM標記之個別基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B基因座；經JOE標記之基因座TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441及Penta C；經TMR標記之基因座

D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白及 Penta D；經 CXR 標記之基因座 D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO 及 Penta E；及經第 6 染料標記之基因座 D8S1179、FGA 及 SE33。如實例 1 中所述實施 PCR 擴增。將擴增產物與經 CC5 標記之大小標記物混合，然後使用 NetBio's Genebench-FX<sup>TM</sup> 分離並檢測，如實例 1 中所述。

### 實例 3

#### 35-STR 基因座多重設計

在 8 色彩擴增及分離及檢測系統中對同時多重擴增之以下基因座之螢光檢測：D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA、SE33、D17S974、D9S1122、D14S1434、D4S2408、D9S2157、D20S1082、D6S1043、D1SGATA113、D10S1435 及 D11S4463。此 35 重設計包括實例 1 及 2 之 25 個 STR 基因座及牙釉蛋白基因座與 9 個額外 STR 基因座。

圖 5 展示採用 8 種染料標記經擴增基因座集合之產物的設計（參見，標題為「Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleic Acids」之申請案第 12/080,746 號，其以引用方式併入本文中）。基因座

D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045及Penta B經染料1標記，TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441及Penta C經染料2標記，D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白及Penta D經染料3標記，D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO及Penta E經染料4標記，D8S1179、FGA及SE33經染料6標記，D17S974、D9S1122、D14S1434、D4S2408、D9S2157及D20S1082經染料7標記，且D6S1043、D1SGATA113、D10S1435及D11S4463經染料8標記。大小標準物經染料5標記。

D6S1043基因座與染色體6上之SE33基因座物理上靠近且因此可與其遺傳連鎖。此多重系統中包括之D6S1043基因座係在中國使用。D17S974、D9S1122、D14S1434、D4S2408、D9S2157、D20S1082、D1SGATA113、D10S1435及D11S4463基因座已由Hill等人(2009，見上文)報導。該等基因座均與多重集合中包括之所有其他基因座相距實質性物理(染色體)距離定位，從而使得不可能與多重體中之其他基因座遺傳連鎖。

多重系統中納入34個STR基因座與牙釉蛋白基因座相對於先前研發之STR多重集合增加顯著複雜性。混合物中包括至少70個引子，從而導致同時共擴增而無偽產物生成之有害後果。納入8種單獨染料標記，以便利用每一者擴增較少基因座，由此允許限制高分子量擴增子之大小。此進而允許較快速且精確地分離擴增產物。

#### 實例4

在8色彩擴增、分離及檢測系統中對同時多重擴增之以下基因座之螢光檢測：D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA、SE33、DYS391、D6S1043、DYS439、DYS389II、DYS19、DYS392、DYS393、DYS389I、DYS390、DYS385a、DYS385b、DYS437及DYS438。

此38重設計包括實例1及2之25個STR基因座及牙釉蛋白基因座、實例3之D6S1043基因座及11個額外的Y染色體STR基因座。

在研究男性至男性遺傳時，Y染色體基因座可有效確定親屬關係。經組合體染色體STR及Y STR多重體在此多維分析中提供額外實用性。可使用該等Y STR基因座來建立叔伯關係、祖父孫子關係、堂兄弟關係及同父異母兄弟關係以及其他關係。已使用Y STR在若干代時段內建立親屬關係。此尤其當分析中缺少中介男性親屬時之二人分析(例如，伯叔父與侄子，沒有來自伯叔父之兄弟(即，侄子之父親)之試樣)係有幫助的。其亦提供附加價值，此乃因其可用於確定父系之地理祖先。因此，該等基因座在研究分析及親屬關係確定中極其有用。

此實例使用8種染料來標記經擴增基因座集合之產物。此使得能夠離散地分離並檢測利用每一染料標記產生之經

擴增產物。

圖6展示採用8種染料標記經擴增基因座集合之產物之設計。基因座D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045及Penta B經染料1標記，TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441及Penta C經染料2標記，D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白及Penta D經染料3標記，D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO及Penta E經染料4標記，D8S1179、FGA及SE33經染料6標記，DYS391、D6S1043、DYS439、DYS389II、DYS19及DYS392經染料7標記，且DYS393、DYS389I、DYS390、DYS385、DYS437及DYS438經染料8標記。大小標準物經染料5標記。

多重系統中納入38個STR基因座與牙釉蛋白基因座相對於先前研發之STR多重集合增加顯著複雜性。混合物中包括至少76個引子，從而導致同時共擴增而無偽產物生成之有害後果。納入8種單獨染料標記，以便利利用每一者擴增較少基因座，由此允許限制高分子量擴增子之大小。此進而允許較快速且精確地分離擴增產物。

#### 實例5

基因座選擇及多重設計。

主要基於STR基因座在美國及歐洲數據庫中之經接受用途來選擇STR基因座用於納入27-基因座多重體中。該等基

因座列示於表 5 中且包括 13 個 CODIS 核心 STR 基因座 (Budowle 等人, Population Data on the Thirteen CODIS Core Short Tandem Repeat Loci in African-Americans, US Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *J Forensic Sci.* 1999; 44: 1277-86)、歐洲標準 12 個 STR 基因座 (其中 7 個與 CODIS 基因座重疊)、用於奧地利數據庫中之牙釉蛋白基因座、D2S1138 及 D19S433 基因座以及用於德國數據庫中之 SE33 基因座 (Parson 等人, Efficient DNA database laboratory strategy for high through-put STR typing of reference samples. *Forensic Sci Int.* 2001;122(1): 1-6; Schneider. Expansion of the European Standard Set of DNA Database Loci-the Current Situation. *Profiles in DNA.* 2009; 12(1): 6-7)。另外, 包括 Penta D、Penta E 及 DYS391 基因座, 最近提議將其納入經擴展 CODIS 核心 STR 集合中 (Hares. Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(1): e52-4), 亦包括常用於中國之 D6S1043 基因座及額外五核苷酸序列基因座 Penta C (因其大重複長度)。

建立允許共擴增 27 個基因座之多重設計需要迭代引子設計及測試。擴增產物小於 500 個鹼基, 此乃因法醫試樣提取物有時含有不大於此長度之 DNA 試樣。自檢視每一基因座可用之 NIST STR 基礎數據及 NCBI DNA 序列來確定每一

基因座之最小及最大擴增子長度需要(國家生物技術資訊中心主頁(National Center for Biotechnology Information Homepage) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/> ; 國家標準與技術研究所主頁(National Institute for Standards and Technology Homepage) : <http://www.cstl.nist.gov/strbase/>)。

在若干情形下，與由市售等位基因分型標準物代表之範圍相比，此多重引子多重體中擴增子範圍實質上有所擴展，此乃因已在引入商業套組後發現新等位基因。儘管在此實例中所述多重引子多重體中納入11個額外基因座且放大個別基因座之經指定擴增子範圍，但27-重分析在整個毗鄰基因座內僅具有4個潛在等位基因重疊之情形，且該等情形僅會發生於極罕見等位基因。此與以下套組相比較為有利：Identifiler套組，其中6對相鄰基因座具有潛在重疊；及Powerplex 16系統，其中8對相鄰基因座具有潛在重疊，兩種套組與27基因座分析相比均具有低得多之STR基因座大小範圍總和及多重密度且具有更多基因座-基因座重疊為適應大量基因座及所選基因座之經放大擴增子大小範圍，使用6種螢光染料來標記PCR引子。多重設計以示意性模式展示於圖7中。圖7顯示27-基因座多重設計。代表所有27個基因座之等位基因之擴增產物的近似大小範圍展示於大小標記物上方。每一大小標記物片段以其對應鹼基大小顯示。用於標記每一擴增子之螢光染料指示在每一各

別基因座名稱之左側。採用以下基因座縮寫：A=牙釉蛋白，D10=D10S1248，D22=D22S1045，Y=DYS391

表5. 所選基因座

	CODIS核心 13個STR基 因座	歐洲 EDNAP/ ENFSI標準 STR集合	奧地利 德國	CODIS 經擴展集合	本發明之 27-基因座 實例
1		牙釉蛋白		牙釉蛋白	牙釉蛋白
2	CSF1PO			CSF1PO	CSF1PO
3		D1S1656		D1S1656	D1S1656
4		D2S441		D2S441	D2S441
5			D2S1338 (奧地利)	D2S1338	D2S1338
6	D3S1358	D3S1358		D3S1358	D3S1358
7	D5S818			D5S818	D5S818
8	D7S820			D7S820	D7S820
9	D8S1179	D8S1179		D8S1179	D8S1179
10		D10S1248		D10S1248	D10S1248
11		D12S391		D12S391	D12S391
12	D13S317			D13S317	D13S317
13	D16S539		D16S539 (奧地利)	D16S539	D16S539
14	D18S51	D18S51		D18S51	D18S51
15			D19S433 (奧地利)	D19S433	D19S433
16	D21S11	D21S11		D21S11	D21S11
17		D22S1045		D22S1045 (不需要)	D22S1045 (不需要)
18	FGA	FGA		FGA	FGA

19			SE33 (德國)	SE33 (不需要)	SE33 (不需要)
20	TH01	TH01		TH01	TH01
21	TPOX			TPOX (不需要)	TPOX (不需要)
22	vWA	vWA		vWA	vWA
23				DYS391	DYS391
24					D6S1043
25					Penta C
26					Penta D
27					Penta E

#### 實例 6

5、6及8色彩光學檢測及電泳儀器。

使用 NetBio's Genebench-FX™ 分離並檢測實例 1 之擴增產物。針對 STR 分析、DNA 定序及 SNP 分型研發並最佳化此儀器且已針對實驗室及場向 (field-forward) 利用進行強化，其闡述於以下文獻及申請案中：Giese 等人 (2009)。

「Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis.」 *J Forensic Sci* 54(6): 1287-96 以及標題為「Ruggedized Apparatus for Analysis of Nucleic Acids and Proteins」之申請案第 11/132,712 號、標題為「Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms」之申請案第 12/080,745 號、標題為「Integrated Nucleic Acid Analysis」之申請案第 12/080,751 號及標題為「Unitary

Biochips」之申請案第13/044,485號，該等文獻及申請案全部以引用方式併入本文中。向2.7  $\mu\text{L}$ 每一擴增產物中添加9.87  $\mu\text{L}$ 甲醯胺及1.02  $\mu\text{L}$  CC5-ILS (內泳道標準物，Promega公司，目錄編號為DG1521)。將試樣加載至分離生物晶片中並藉由施加90 sec 350 V/cm電場電泳移動至分離通道中。此後沿分離通道施加150 V/cm電場以分離DNA片段。在50°C下實施所有分離。利用固態(488 nm)雷射激發附接至分離產物之染料且藉由二色濾波器及帶通濾波器以波長分離螢光，並藉由一組5個光電倍增管檢測。使所得圖譜經受數據處理及色彩分離軟體以展示以其個別染料代表之片段。

Genebench FX儀器針對場向應用進行強化，具有低功耗，且在Low Voltage Directive 73/23/EEC下經CE標記。為實施分離及檢測，將微流體生物晶片置於儀器之生物晶片室中。生物晶片室提供高電壓、激發及檢測及熱子系統與生物晶片之耦合。經由一組電極板將高電壓施加至生物晶片。藉由晶片室之封蓋上之彈簧針連接(pogo pin connection)達成儀器與生物晶片間之接觸。高電壓子系統允許將高達10 KV施加至分離通道，且視情況將高達1.5 KV施加至試樣加載通道。亦可使用氣動壓力將試樣加載至分離通道中。預程式化腳本藉由控制轉換組態、電壓位準及電源之定時允許自動化操作。將一組電阻箔加熱器安裝至生物晶片室內之加熱板上以提供生物晶片之精確且一致之加熱。

由雷射、檢測器及光學元件串(optical train)組成之光學系統提供經染料標記DNA分子之雷射激發及螢光檢測，該等分子以電泳方式沿分離通道運行至生物晶片之激發及檢測窗。光學激發係藉由200 mW 488 nm雷射(Coherent, Santa Clara, CA)達成。多色彩檢測係藉由一組二色鏡、帶通濾波器(Omega Optical, Brattleboro, VT)及5個光電倍增管(PMT)(Hamamatsu, Bridgewater, NJ)達成。一組透鏡、電流計及10X物鏡將生物晶片與雷射及檢測器耦合。檢測係使用步進凝視法(step-stare approach)達成，其中電流計經佈置以激發第一通道且經固定積分時間自此通道收集螢光。然後電流計經佈置以自毗鄰通道激發並收集螢光，且重複此過程直至詢問生物晶片中之所有通道。除單-或多色彩量化外，此光學組態亦能夠實施4色彩DNA序列分析、1-5色彩SNP分析及4-及5色彩多重DNA片段定大小分析。

在基於對Genebench FX光學元件串之改進之儀器上分離6-及8色彩反應之擴增產物。此方法闡述於標題為「Integrated Nucleic Acid Analysis」之美國專利8,018,593中。經改進儀器係基於對由攝譜儀組成之檢測系統的研發，該攝譜儀具有色散光柵及線性陣列檢測器以替代Genebench FX儀器之二色鏡、帶通濾波器及離散光電倍增管檢測器。

選擇具有以下規格之攝譜儀：

- 像差校正凹面全訊光柵。此光柵設計允許具有單一光學元件之攝譜儀。

- 固定光柵座。將光柵牢牢地安裝於攝譜儀內並鎖定就位。藉由釋放光柵座上之鎖緊螺釘並旋轉光柵來針對波長校準調節光柵定向。牢牢地安裝光柵以增加攝譜儀之堅固性。
- 焦距。選擇100 mm焦距攝譜儀以滿足解析度需要(1 nm至5 nm)，同時維持最小覆蓋區。
- 針孔。攝譜儀入口處之1.0 mm針孔允許最大光收集及背景光減少。
- 輸出窗。32 mm×10 mm之輸出窗允許波長分離光成像至線性陣列檢測器。
- 檢測器安裝。4個螺紋螺絲孔位於攝譜儀之輸出窗附近以用於安裝線性陣列檢測器。

選擇像差校正凹面全訊光柵用於攝譜儀。光柵規格係：

- 影像平面處之平面場。該等光柵校準來自入口狹縫之光並將其重新聚焦至平面表面上以用於直接成像至線性陣列檢測器上。
- 大小。42.4×42.4 mm光柵允許最大光收集。
- 槽密度。1200槽/mm光柵允許滿足波長範圍及解析度需要。
- 閃耀波長。選擇450 nm之閃耀角以達成以可見範圍為中心之峰光柵效率。
- 色散。達成藉由槽密度界定之7 nm/mm色散。此允許224 nm之波長範圍於輸出處在32 mm影像平面內成像。

- 波長範圍-350 nm至850 nm之波長範圍允許分離可見染料之發射光譜(在520 nm至700 nm範圍內)並針對波長校準檢測雷射發射(488 nm及514 nm)。

Genebench FX之光學基板經改進以適應經整合波長分離及檢測模組。安裝支架經設計並製造以將經整合檢測模組安裝至基板上。整合檢測模組位於基板上，以使得輸入埠之位置保持Genebench之檢測路徑長度。將位於經定製設計並製造之座上之鏡安裝於基板上。該鏡允許儀器容易地經組態以供利用經整合波長模組或現有濾波器及離散PMT來操作。光學元件串之該等改進產生束徑。

在一些實施例中，利用總共9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、21種、22種、23種、24種、25種、26種、27種、28種、30種、35種、40種或更多種螢光染料來標記引子。可施加攝譜儀、光柵、檢測器及雷射之各種組態及組合以自該等數目之螢光染料產生並收集螢光。光柵參數規格允許波長範圍及中心波長界定波長範圍及中心波長。可藉由擴展光柵之波長範圍檢測最大染料數目。壓縮波長範圍允許較高波長解析度。波長範圍移位至較低波長將允許檢測紫外染料，而波長範圍移位至較長波長允許檢測近紅外及紅外染料。利用光柵調節中心波長與波長範圍二者之能力允許檢測UV、可見、近紅外及紅外染料。多個攝譜儀、光柵及檢測器模組可串聯實施以達成寬波長範圍及高波長解析度檢測，從而適應大量染料之檢測。在此組態中，入射螢光

經二色鏡分裂且此光之每一部分隨後入射於攝譜儀、光柵及檢測器模組中之一者上。線性檢測器模組(包括PMT、崩潰光二極體(avalanche photodiode)、CCD)之合適選擇允許有效檢測螢光。

一般而言，較短波長雷射激發在自UV及可見染料產生螢光方面較有效，而較長波長激發對於自近紅外及紅外染料產生螢光而言較有效。為能夠同時自大量染料檢測，可串聯使用來自多個雷射源之多個雷射激發波長。在利用寬波長範圍及超出可見光之波長範圍時，與寬範圍之染料(例如Cy7及Cy7.5，分別為773 nm及808 nm)及最大波長為800 nm至900 nm之紅外染料匹配之光學系統使得能夠利用一大組螢光染料來標記引子。

#### 實例7

#### 染料選擇.

在選擇用於6-染料多重研發之螢光染料時，建立工作性5-染料集合並評估新染料候選物與此收集物之相容性。表6之上部列示FAM、JOE、TMR、CXR及CC5之5-染料集合以及每一染料之最大激發及發射波長。

表6. 用於納入多重集合中之螢光染料之實例.

螢光染料	Exc <sub>最大*</sub> (nm)	Em <sub>最大**</sub> (nm)
FAM	495	522
JOE	528	554
TMR	546	574

CXR	580	605
CC5	645	669
5-FAM	493	522
螢光素	495	522
Atto 488	501	523
R110	501	525
TET	522	538
R6G	529	549
VIC		552
HEX	535	553
TAMRA ([F]dNTP)	555	572
NED	553	573
NED	553	575
TAMRA ([F]dNTP)	560	583
麗絲胺(Lissamine)-玫瑰紅	572	590
PET		591
ROX	587	607
DyLight 594	592	616
HiLyte Fluor 594	593	616
SID		620
Atto 594	601	627
Atto 610	615	634
Atto 620	619	643
Atto Rho14	625	646
DyLight 633	623	647
LIZ		655
Cy5.5	673	692
HiLyte Fluor 680	680	699

WellRed D3	685	706
Cy 7	750	773
Cy 7.5	788	808

\*  $Exc_{最大}$  : 最大激發波長(奈米)。

\*\*  $Em_{最大}$  : 最大發射波長(奈米)。

圖8展示利用5種核心染料與DyLight 633中之每一者觀察到之發射光譜。對於該6種染料，可利用每一相鄰染料對之間之4個或更多個攝譜儀通道分離來不同地檢測每一染料。此分離量允許產生完全分離所有6種色彩之色彩校正矩陣。由於經ATTO 488標記之產物比相同產物之經FAM標記形式產生更強輸出發射，且兩種染料以相似波長發射，因此在多重集合中用ATTO 488染料替代FAM染料。

#### 實例8

##### 8-色彩染料檢測及分離。

評估經改進光學系統同時檢測經8種螢光染料標記之STR產物的實用性。8種所選染料係彼等實例7中所討論者與最大發射波長為590 nm之麗絲胺-玫瑰紅染料及最大發射波長為627 nm之ATTO 594染料。為測試此模式，分別針對8個單獨引子對中之每一者產生經不同方式定大小之擴增產物，其中每一引子對係由一個未經標記引子及一個經標記引子組成，其中該標記係選自8種不同螢光染料中之一者。在產生並施加色彩校正矩陣以解析重疊光譜信號後，獲得所用染料中每一者之無噪信號(圖9)。

#### 實例9

### 單重及微型多重(Miniplex)測試

多重構築發生於諸多階段且通常遵循自單重引子(monoplex)建立若干核心基因座集合、隨後於彼等集合上建立之策略，如吾人之先前著作中所述(Krenke等人，Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. J Forensic Sci. 2002; 47(4): 773-85；Lins等人，Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. J Forensic Sci. 1998; 43(6):1168-80；Lins等人，Multiplex Sets for the Amplification of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci--Silver Stain and Fluorescence Detection. BioTechniques. 1996; 20(5): 882-9)。首先，如材料及方法中所述設計單重擴增每一個別基因座之引子對。使用0.5  $\mu$ M正向引子及0.5  $\mu$ M反向引子測試單重性能，其中每一對中之一個引子經選自FAM、JOE、CXR及ROX之染料集合螢光染料標記。

組合產生強擴增產物而不產生顯著偽產物(不包括由STR基因座展現之典型殘跡及不完全非模板添加(iNTA))之引子對群組以同時測試4個至6個基因座之小引子對集合(即，微型多重體(數據未顯示)。在多數情形下，藉由共擴增不會產生意料之外之擴增基因組序列(即偽產物)。一些集合展示偽產物且此等結果需要重新設計引子並重新進行單重測試。對引子之個別逐對組合之擴增產物的分析顯示參與偽產物之產生之引子。以小多重模式再測試通過單重評估之經重新設計引子以鑒定較強候選組合，以用於在稍

後階段之完全多重體。此研發之任一階段之失敗嘗試(包括產生偽產物片段之組合)均需要在單重基因座階段處重新設計，其中在單重階段與多重階段二者處進行測試。

#### 實例10

偽產物減少或去除：iNTA.

STR基因座擴增經常展示殘跡偽產物。該等偽產物通常(但並非總是)為比真正等位基因短之單重複長度(Klitschar 等人 Polymerase slippage in relation to the uniformity of tetrameric repeat stretches. Forensic Sci Int. 2003; 135(2):163-6 ; Shinde 等人 Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. Nucleic Acids Res. 2003;31(3): 974-80)。已知選擇用於國家及國際數據庫且因此用於此工作之基因座的殘跡量可根據標準拷貝數評估與單一源試樣之DNA圖譜分析中之真正等位基因區別。

在完成模板依賴性聚合後不完全添加非模板核苷酸係通常在STR擴增產物中觀察到之第二偽產物(Clark. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 1988年10月25日 ; 16(20): 9677-86 ; H. DNA Polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment. DNA and Cell Biology. 1993; 12(8): 763-70 ; Magnuson 等人 Substrate nucleotide-

determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *BioTechniques*. 1996年10月 ; 21(4):700-9)。此偽產物係作為比真正等位基因小一個鹼基之第二片段觀察到。其存在通常會降低真正等位基因之峰高度且可因兩個代表一種等位基因之片段的出現而產生混淆。當初始引子設計未達成完全模板添加時，將由Brownstein推薦之DNA序列5'-GTTTCTT-3' (Brownstein等人，Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques*. 1996 Jun; 20(6): 1004-6, 8-10)添加至引子對中未經標記引子之5'末端以刺激較完全的非模板添加。在若干情形下，測試僅5'-末端-G之添加以達成相同效應。在一些情形下，替代方法係顛倒引子對中之經標記引子及未經標記引子以產生未經標記引子之替代5'末端。iNTA減少之實例展示於圖10中。

圖10A闡釋用以減少iNT之GTTTCTT尾添加。上圖展示D18S51引子對擴增產物，其中不將5'-GTTTCTT-3'序列尾添加至未經標記引子之5'-末端。下圖顯示使用經修飾引子對之產物。此變化將iNTA自上圖中之約150%減少至下圖中之小於10%。其亦增加片段長度。圖10B闡釋用以減少iNTA之至未經標記引子之5'末端之G-尾添加。上圖展示D2S441引子對擴增產物，其中不將5'-G-3'序列尾添加至未經標記引子之5'-末端。下圖顯示使用經修飾引子對之產

物。此變化將 iNTA 自上圖中之約 90% 減少至下圖中之小於 10%。其亦增加片段長度。圖 10C 闡釋顛倒引子對中之經標記引子以減少 iNTA 之產物。上圖展示利用原始 ROX 染料標記方案之 D8S1179 引子對擴增產物。下圖顯示使用引子對中經 ROX 標記之相反引子之產物。此變化將可見 iNTA 自上圖中之約 80% 減少至下圖中之小於 10%。此不會改變明顯片段長度，但明顯片段之此等改變可端視擴增產物之序列變異而發生。

因引子與核酸之不期望相互作用而產生之 STR 偽產物包括(但不限於) iNTA、殘跡及擴增子，其與引子序列亦及 PCR 反應條件有關。酶、緩衝液以及循環時間及溫度(及儀器驅動之溫度斜坡升高速率)可對偽產物產生及減少具有顯著效應。該等因素亦可影響個別擴增子之相對信號強度。因此，在研發 STR 多重體時，重要的是考慮基於給定擴增條件集合來最佳化引子。例如，用於 90 分鐘 PCR 反應之最佳多重體可能非常需要針對 20 分鐘 PCR 反應中之相似性能進行改進。

#### 實例 11

自多重擴增產物去除偽產物。

擴增偽產物係自兩個引子與基因組序列之不期望相互作用產生，其中至少一個引子經標記，該等基因組序列對於所涉及引子中之至少一者而言並非引子設計中之期望雜交靶。此等偽產物可藉由首先鑒定偽產物產生中涉及之引子來去除。此可藉由自完全多重體一次去除一個引子或引子

對以將具體引子之去除與具體偽產物之去除相關聯來達成。在鑒定產生偽產物之候選引子後，可使用該兩個候選引子在其他引子不存在下擴增試樣以驗證其在偽產物產生中之作用。重新設計一個或兩個引子、之後再測試經常去除偽產物，同時保持所有多重基因座之擴增。在將重新設計引子納入多重體集合中後，經常需要努力再平衡多個基因座在多重體中之表現。

圖 11A、11B 及 11C 展示利用 5 色彩 GeneBench FX 檢測儀器對 6 色彩擴增產物之檢測。在相同 PMT 通道中檢測經 DL633 標記之試樣擴增片段及經 CC5 標記之大小片段。圖 11A 闡釋兩個產生偽產物之情形。注意經 ATTO488 標記且位於 107 鹼基 (B107) 處之相對較弱片段及一系列在 193 鹼基位置 (B193) 周圍之經 ATTO488 標記之片段。在圖 11B 之左圖中以放大方式闡釋該等相同偽產物。圖 11B 之右圖展示在用經修飾序列之引子替代兩個個別引子後之擴增。圖 11C 闡釋在引子替代後之試樣擴增產物平衡保持。

## 實例 12

### 選擇染料以改良擴增產物強度

可使用若干不同方法來嘗試在多重擴增之情況下自個別基因座增加擴增產物強度。例如，可採用引子重新設計以結合新基因組序列或提供較穩定雜交。或者，增加或降低基因座之引子之引子濃度可相對於其他基因座改變產物強度。有時，改進其他基因座之引子之引子濃度或總體混合引子濃度可改變擴增產物強度。改進方案(包括較低退火

溫度或較多擴增循環)亦可改變相對擴增產物表現。材料及方法之該等變化不會改良實例1中所述且展示於圖1中之26-基因座多重集合中SE33擴增產物之量。實例7中之染料研究向吾人顯示，使用ATTO488染料比使用FAM染料提供擴增產物之相對更強表現。用ATTO488代替FAM再標記經標記之SE33引子且相對於多重集合中之其他基因座觀察到合意的更強擴增產物表現。

在圖12中，用於產生展示於各圖中之擴增產物之染料指示於各別圖之左端。此圖展示顯示強SE33擴增產物之26-基因座擴增。比較此擴增之經ATTO488標記之SE33擴增產物之相對強度與彼等在圖1中利用經FAM標記之SE33產物所觀察到者。較強表現源自自ATTO488染料檢測到之較強光發射。亦將D3S1358、D19S433及D2S1338之經標記引子自經FAM標記轉化成經ATTO488標記以確保該4個基因座之光譜檢測在多重染料集合之情況內保持一致。

### 實例13

#### 建立並組合微型多重體作為多重研發策略

組合若干微型多重集合，各自展示每一個別基因座之順利擴增產物且缺乏非特異性產物或與其他引子序列有關之偽產物以產生19-基因座多重體。自另一微型多重體添加3個額外基因座以產生22-基因座形式且隨後個別地添加其餘引子對。測試每一中間多重體以鑒定與引子有關之偽產物，評估基因座-基因座平衡並驗證相鄰基因座之擴增產物未重疊。藉由將特定偽產物之存在及不存在與來自完全

引子集合之一個引子之存在或不存在相關聯來鑒定造成許多與引子有關之偽產物中每一者的引子。冒犯性引子經重新設計並再測試以解決該等後期研發階段之多數問題。再測試包括對經驗性非理論性結果之小心擴增子範圍大小分析以確保相同色彩之相鄰基因座之等位基因不會重疊。通常利用向一或兩個引子之5'末端添加序列以重定大小來解決基因座重疊之情形。使用3種不同方法來調節基因座-基因座平衡：a)調節輸入引子濃度；b)調節PCR擴增反應之退火溫度，及c)引子重新設計。在該等調節後，圖13A展示採用基因座平衡之27-基因座多重集合之2.8 ng男性DNA試樣的19.5分鐘擴增。圖13B闡釋女性DNA試樣之6色彩27-基因座擴增。使用8色彩光學系統分離並檢測擴增產物。

#### 實例14

納入較多染料允許較小擴增產物。

相對於5色彩檢測改良之6色彩檢測或8色彩檢測允許出於人類鑒定目的改良多重系統之設計。對人類殘骸進行操作之困難之一係(例如)一些試樣含有經降解DNA。當出現這種情形時，對較大擴增子之擴增變得更困難或甚至不可能。存在6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、14種、16種或更多種染料使得能夠重新設計多重STR擴增集合以產生較小擴增產物。此將進而允許試樣擴增之較高成功率。

圖14A展示在多重集合中含有13個CODIS STR核心基因

座之5色彩設計。其假定無擴增產物之限制低於70個鹼基且在毗鄰基因座之間需要5個至10個鹼基以允許實質上非重疊STR分析。CODIS 13 STR基因座構成689個鹼基之STR基因座大小範圍總和。假定限制所選基因座之基因座大小範圍且需要保留大小標記物之一種色彩，則可將3.25基因座/色彩之平均值設計至每一色彩中，從而產生235個鹼基之多重大小範圍及2.93之多重密度。

圖14B展示含有與圖14A中之5色彩設計具有相同限制之相同基因座的6色彩設計。在納入第6種染料後，多重集合之大小上限係約275個鹼基。另外，平均基因座/色彩係2.6且每一色彩中基因座之較低數目使得較容易避免偶基因之基因座-基因座重疊之可能性以允許實質上非重疊STR分析。多重大小範圍係205個鹼基且多重密度係3.36。

圖14C展示含有與圖14A中之5色彩設計及圖14B中之6色彩設計具有相同限制之相同基因座的8色彩設計。在納入8種染料後，多重集合之大小上限係約230個鹼基。此外，FGA基因座之大等位基因極其罕見，因此較常見等位基因不會超過155個鹼基。此等位基因大小之實質性減少實質上增加獲得具有經降解試樣之完整圖譜之能力。另外，1.86係平均基因座/色彩且每一色彩中基因座之較低數目使得較容易避免偶基因之基因座-基因座重疊之可能性以允許實質上非重疊STR分析。實際上，每一色彩中僅有兩個或更少基因座且多重集合中僅有6個相鄰基因座對，相同色彩中基因座對之間之增加之間隔使得可完全避免此風

險，如圖14C中所示。此模式之多重大小範圍(包括極罕見高分子量FGA等位基因)係160個鹼基且多重密度係4.31。

表7中比較3種形式之13-STR CODIS核心多重集合之多重含量、STR基因座大小範圍總和、多重大小範圍及多重密度。

表7. 多重集合中之13-STR CODIS核心基因座之比較

多重含量	STR基因座大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
13個基因座 -5種染料	689	235	2.93
13個基因座 -6種染料	689	205	3.36
13個基因座 -8種染料	689	160	4.31

#### 實例15

#### 24-基因座23-STR正式基因座多重體

具有增加之多重密度之多重設計提供多重擴增分析之較大效率。此方法允許評估較小大小範圍內之多型性基因座之較多替代形式。此進而允許獲得增加之資訊及參照更多所獲得資訊。

圖15展示同時共擴增牙釉蛋白基因座與以下23個STR基因座之手段：D3S1358、SE33、D6S1043、TH01、D18S51、D1S1656、D19S433、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、CSF1PO、D5S818、

D13S317、D7S820、TPOX、D2S1138、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179及D10S1248。此多重設計之STR基因座大小範圍總和係1286，多重大小範圍係340個鹼基，且多重密度係3.78。

#### 實例 16

##### 23-基因座 22-STR正式基因座多重體

具有增加之多重密度之多重設計提供多重擴增分析之較大效率。此方法允許評估較小大小範圍內之多型性基因座之較多替代形式。此進而允許獲得增加之資訊及參照更多所獲得資訊。

圖 16 展示同時共擴增牙釉蛋白基因座與以下 23 個 STR 基因座之手段：D3S1358、D6S1043、TH01、D18S51、D1S1656、D19S433、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、CSF1PO、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、D2S1138、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179及D10S1248。此多重設計之STR基因座大小範圍總和係1136，多重大小範圍係300個鹼基，且多重密度係3.79。

#### 實例 17

##### 22-基因座 21-STR正式基因座多重體

具有增加之多重密度之多重設計提供多重擴增分析之較大效率。此方法允許評估較小大小範圍內之多型性基因座之較多替代形式。此進而允許獲得增加之資訊及參照更多所獲得資訊。

圖 17 展示同時共擴增牙釉蛋白基因座與以下 23 個 STR 基因座之手段：D3S1358、TH01、D18S51、D1S1656、D19S433、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、CSF1PO、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、D2S1138、D22S1045、DYS391、FGA、D8S1179 及 D10S1248。此多重設計之 STR 基因座大小範圍總和係 1072，多重大小範圍係 292 個鹼基，且多重密度係 3.67。

#### 實例 18

#### 21-基因座 20-STR 正式基因座多重體

具有增加之多重密度之多重設計提供多重擴增分析之較大效率。此方法允許評估較小大小範圍內之多型性基因座之較多替代形式。此進而允許獲得增加之資訊及參照更多所獲得資訊。

圖 18 展示同時共擴增牙釉蛋白基因座與以下 23 個 STR 基因座之手段：D3S1358、TH01、D18S51、D1S1656、D19S433、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、CSF1PO、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、D2S1138、D22S1045、FGA、D8S1179 及 D10S1248。此多重設計之 STR 基因座大小範圍總和係 1044，多重大小範圍係 278 個鹼基，且多重密度係 3.76。

#### 實例 19

#### 6 色彩 SNP 分析

利用超過 6、7、8、9、10、11、12、14、16 或 24 色彩檢測進行檢測亦改良非 STR 評估，例如 SNP 測試，此改良係

藉由允許改良設計尤其用於人類及獸醫鑒定、臨床及獸醫診斷、生物威脅檢測、食品安全及工業測試目的之多重系統來達成。特定而言，利用較多染料區別較小產物，如上文針對STR多重分析所顯示。或者，當使用較多染料時，可在相同大小範圍限制內測試較多基因座。一般而言，染料數目愈大，可自單一試樣及單一檢測泳道獲得之資訊愈多。

在此實例中，闡述6-染料能力分析6種SNP以確定人類之虹膜色彩之用途。先前，由Walsh公佈之分析(Walsh等人(2011, *Iris IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye color in the absence of ancestry information. Forensic Science International: Genetics* 5: 170-180.)係基於人類試樣DNA之6個區域之擴增、之後單鹼基延伸分析(Chen等人3003, *Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost, and throughput, The Pharmacogenomics Journal* 3: 77-96)以詢問擴增PCR產物中每一者內一個別鹼基之存在。該測試係作為5-染料分析來實施，其中大小標記物保留5種色彩中之一者。以4種色彩檢測所有6個所關注位點中每一者之兩種潛在替代SNP產物，即12種潛在產物，其中產物大小在24個至54個鹼基範圍內。使用本發明之7種染料方法時，可將單鹼基延伸產物範圍縮小至(例如)48個鹼基。製備並純化單鹼基延伸分析中檢測較長產物所需較長寡核苷酸的困難顯示產生如本文所提議依賴於較短寡核苷酸之分析之

優點。

在此方法之延伸中，許多SNP分析需要在單一反應及檢測泳道中詢問超過10種、超過20種、超過30種、超過50種、超過100種、超過200種、超過300種、超過400種、超過500種、超過1000種、超過2000種、超過300個或超過5000種個別SNP。在分析中納入6色彩系統、8色彩系統或更多色彩系統允許在與目前5色彩分析相同之大小範圍內實施更多SNP分析。

用於SNP分析中之試樣可包括試樣中之經擴增或未經擴增核酸，包括藉由PCR擴增之產物。該等分析包括(但不限於)電泳分離及檢測以及基於微陣列之分析。6個或更多個螢光標記可在暴露於至少3種SNP多型性之前或之後附接至寡核苷酸。例如，可在用於方法中之前或在納入具有核苷酸之標記之引子延伸分析的過程期間標記寡核苷酸。

SNP分析之若干替代方法可經由應用本發明改良。一種方法係擴增核酸試樣，然後在經差別標記之二去氧-dNTP存在下利用未經標記引子(寡核苷酸)實施引子延伸(Syvanen, A-C等人, 1990. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotypin of apolipoprotein E, Genomics 8: 684-692.)。使用不同長度未經標記之引子來實施引子延伸以產生不同長度產物。使用不同染料用於檢測以與針對經擴增STR產物相同之方式向檢測過程增加維度。在該方法之變化形式中，例如，可納入去氧核苷酸與二去氧核苷酸之混合物。

另一替代方法涉及採用6個或更多個、較佳8個或更多個螢光標記之寡核苷酸進行等位基因特異性雜交。(Wallace 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch, *Nucleic Acides Research* 10:3543-3557.)

本發明之另一實施涉及在一個未經標記引子及兩個經差別標記之具有相同(或接近相同)序列之引子存在下對於每一所分析SNP使用PCR (Choi等人, 2012. Integrated allele-specific polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for single nucleotide polymorphism genotyping. *Biosens. Bioelectron.* 35: 327-334)。在罕見情形下, 對於每一SNP位點可使用最多4個經差別標記之引子。以與STR基因座產物相同之方式藉由大小分離或色彩差別來分離及檢測該等擴增產物。

施加至SNP分析之本發明之另一實施涉及在核酸靶存在下使用聚合酶、緩衝液、去氧核苷酸三磷酸與二去氧核苷酸三磷酸之混合物的組合進行序列引子延伸。在此過程期間, 來自一個核酸靶之擴增產物經4種附接至dNTP或二去氧NTP之不同螢光染料標記(Sanger、Nielen及Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467)。在單獨位點中, 第二核酸靶亦經4種附接至dNTP或二去氧NTP之不同染料標記。試樣可單獨地運行, 或在本發明之形式中, 混合, 然後分離並檢測以供分析。

可將至少6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種、14種、15種、16種、17種、18種、19種、20種、25種、30種、35種、40種、50種或更多種螢光染料之用途施加至多種SNP檢測方法(Chen及Sullivan, 2003, Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost, and throughput. *The Pharmacogenomics Journal* 3: 77-96; Syvänen, 2001, Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nature Reviews* 2: 930-942; Kwok, 2000. High-throughput genotyping assay approaches, *Pharmacogenetics* 1:1-5; Kwok, 2003 Detection of single nucleotide polymorphisms, *Current Issues in Molecular Biology* 5:43-60; Kim等人, SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications *Annual Review of Biomedical Engineering*, 第9卷: 289-320, 2007; Nassir等人, An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels, *BMC Genetics* 2009, 10:39)。

與本文所述電泳分離及光學檢測能力組合, 可針對大量SNP尤其詢問法醫、臨床、獸醫、食品安全及工業微生物試樣。與本發明之定序分析及多重分析以及其他分析組合, SNP分析(包括高度多重SNP分析)可提供大量關鍵資訊。視需要, 該等SNP分析單獨或組合可適於微流體生物晶片, 包括完全整合微流體生物晶片系統。

## 實例 20

## 用於 SNP 分析與 STR 分析之組合之 6-色彩分析

實例 2、實例 3、實例 5、實例 15、實例 16、實例 17 及實例 18 闡述使用 6 種或更多種染料來允許同時擴增並分析增加數目之體染色體 STR 基因座、較大基因座大小範圍總和分析及增加之多重密度。實例 4 闡述使用 6 種或更多種染料來允許同時擴增並分析增加數目之體染色體 STR 基因座與 Y STR 基因座之組合。實例 19 闡述使用 6 種或更多種染料來允許同時擴增並分析增加數目之 SNP 基因座或在 SNP 基因座分析中對多重大小範圍之需要。

亦可使用藉由對 6 種、7 種、8 種、10 種、12 種、14 種、24 種或更多種染料進行納入、檢測及色彩分離所允許增加之大小範圍分析來同時分析不同標記物類型。特定而言，可在經分離擴增產物之相同單一通道或泳道中檢測實例 19 中所述基於 SNP 之虹膜檢測分析及實例 5 及若干其他實例中所述基於體染色體 STR 之鑒定分析的擴增產物。因此，可使用該方法來同時確定身份及物理性狀分析。

可同時針對多個標記物類型、多個 DNA 源及多個功能目的來分析組合不同多型性標記物類型(例如 STR、SNP、序列變體)與不同染色體類型源(例如體染色體、X 染色體、Y 染色體、粒線體、細菌、真菌、植物)且用於不同目的(例如身份、親屬關係確定、法醫學、物理性狀、傳染性病、遺傳特性)之多重擴增集合。該等類型之多重擴增集合亦可與非多型性核酸標記物組合，該等標記物提供關於

生物體或另一含有核酸之試樣材料之存在、不存在、鑒定或條件的診斷資訊。

## 實例 21

### 雙序列分析

實施 DNA 序列分析以確定 4 個不同核苷酸在構成人類基因組之染色體中之順序。儘管可獲得多種序列分析方法，但傳統普及方法係由 Sanger 等人研發 (1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74: 5463-5467.)，其採用在未經標記之去氧核苷酸三磷酸與經螢光標記之二去氧核苷酸三磷酸之混合物存在下之引子延伸。4 個經差別螢光標記之二去氧核苷酸三磷酸針對每一各別鹼基且以指示位置或各別鹼基之不同長度終止鏈延長。

使用 8 色彩檢測允許納入 Sanger 定序產物之兩個不同的非重疊染料色彩集合用於檢測並單獨解釋單一泳道之分離產物。因此，在單一分離測試中同時自兩個定序反應檢测定序產物。此外，能夠以單一反應體積使用二去氧核苷酸三磷酸之非重疊染料色彩集合同時對兩個不同 DNA 區域定序以用於單獨序列之隨後分離、檢測及分析。

以 4 之倍數增加色彩數目成比例地增加可在單一檢測泳道上分析之 DNA 序列數目 (例如 16 種色彩允許 4 組序列)。藉由明智地選擇染料數目及分析需要，可使用單一試樣來收集大量資訊。例如，單一人類試樣可提供身份及親屬關係資訊 (例如使用 6 種色彩及 STR 分析)、表型資訊 (例如使

用6種額外色彩及SNP分析)及粒線體遺傳資訊(例如使用4種色彩及定序分析)。類似地,可使用該方法來實施人類鑒定及親屬關係分析(例如使用8種色彩及STR分析)及確定病原體身份及治療方案(例如使用8種色彩及兩個多重定序分析);此組合可用於分析送至急診室之具有敗血症體徵之未經鑒定個體的血液試樣。在第3種情形下,可使用分析來提供身份資訊(例如使用6種色彩及STR分析)、與組織分型或癌症分期有關之臨床診斷資訊(例如使用4種額外色彩及定序分析);此組合可用於術內評估組織,同時提供關於組織供體之身份之保證。

該等應用僅係藉由本發明教示內容所達成大量分析組合中之三者。可基於該等教示內容實施之分析包括個別及組合分析,包括(但不限於)核酸擴增(例如單重及多重端點PCR、即時PCR、反轉錄PCR、不對稱PCR、巢式PCR、LATE PCR、降落式PCR、數位PCR、滾環式擴增、鏈替代擴增及多重置換擴增);Y-STR擴增;微型-STR擴增;單核苷酸多型性分析;VNTR分析;RFLP分析;核酸定序(例如Sanger定序、焦磷酸定序及單分子定序);反轉錄;核酸連結;核酸雜交;免疫分析;結合分析;蛋白質分析;酶促分析;質譜術;以及核酸及蛋白質量化。

### 【圖式簡單說明】

圖1 5色彩26-基因座、25-STR正式基因座之設計。

圖2A係實施PCR之微流體生物晶片之照片。

圖2B係接受圖2A之生物晶片之快速熱循環器的照片。

圖3係26-基因座、25 STR正式基因座多重反應上每一基因座之擴增產物的色彩校正掃描。

圖4闡釋25-STR基因座實質上非重疊STR分析之設計。

圖5展示採用8染料來標記經擴增基因座集合之產物的設計。

圖6展示採用8種染料來標記經擴增體染色體STR及Y STR基因座集合之產物的設計。

圖7闡釋允許在單一反應中共擴增26 STR基因座及牙釉蛋白基因座之設計。

圖8闡釋核心5-染料集合及DyLight 633 (DL633)染料之發射光譜圖。跨圖之底部書寫檢測器通道。相對信號強度顯示於Y-軸上。每一加框域中之數字代表每一各別染料之最大發射波長(nm)。

圖9闡釋擴增產物之8色彩分離之基線扣除及色彩校正電泳圖。在實例6之8色彩儀器上分離並檢測擴增產物。擴增片段係在每一框中藉由用於標記其之染料指示。

圖10A闡釋向未經標記引子之5'末端添加GTTTCTT尾以減少iNTA之效應。

圖10B闡釋向未經標記引子之5'-末端添加G-尾以減少iNTA之效應。

圖10C闡釋將染料標記自D8S1179引子對中之一個引子交換至另一者之效應。

圖11A表示以5種色彩展示之6-染料26-基因座多重擴增產物在GeneBench FX儀器上分離後之情況下，在消除偽產

物之前兩種偽產物之存在(箭頭下)。

圖 11B 表示以 5 種色彩展示之 6-染料 26-基因座多重擴增產物在 GeneBench FX 儀器上分離後，在消除偽產物之前兩種偽產物之存在(左圖中箭頭下)及在消除偽產物後其不存在(右圖中箭頭下)的放大視圖。

圖 11C 表示以 5 種色彩展示之 6-染料 26-基因座多重擴增產物在 GeneBench FX 儀器上分離後之情況下，在消除偽產物之後兩種偽產物之不存在(箭頭下)。

圖 12 闡釋在如本發明所述研發之 6-/8 色彩儀器上分離並檢測之男性 DNA 的 6 色彩 27-基因座擴增產物。

圖 13A 闡釋在 6-/8 色彩儀器上分離並檢測之男性 DNA 的 6 色彩 27-基因座擴增產物。

圖 13B 闡釋在 6-/8 色彩儀器上分離並檢測之女性 DNA 的 6 色彩 27-基因座擴增產物。

圖 14A 展示採用 5 種染料來評估 CODIS 13 個核心 STR 基因座之設計。

圖 14B 展示採用 6 種染料來評估 CODIS 13 個核心 STR 基因座之設計，該等染料闡釋所需較小多重大小範圍及所達成較大多重密度。

圖 14C 展示採用 8 種染料來評估 CODIS 13 個核心 STR 基因座之設計，該等染料闡釋所需較小多重大小及所達成較大多重密度。所包括表闡釋 5-染料、6-染料及 8-染料選擇之多重大小範圍及多重密度之數值。

圖 15 展示 24 基因座擴增設計。

圖 16 展示 23 基因座擴增設計。

圖 17 展示 22 基因座擴增設計。

圖 18 展示 21 基因座擴增設計。

SEQ ID NO.	實例 1 基因座	序列(5'至 3')
1	AMEL	CCCTGGGCTCTGTAAAGAA
2	AMEL	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG
3	CSF1PO	CCGGAGGTAAAGGTGTCTTAAAGT
4	CSF1PO	ATTTCTGTGTCAGACCCTGTT
5	D1S1656	GCGCCTGGTCTTTGTTTAT
6	D1S1656	AGAAAATCCCCATATAAGTTCAAGC
7	D2S1338	CAAAACCCTGAAAATGGCAATT
8	D2S1338	AGTGTTTCATGCCTACATCCC
9	D2S441	CTTCCTCCAGGGTATTAATGGG
10	D2S441	ACATCACAAAATCTTCACTCTCC
11	D3S1358	CCCCACTGCAGTCCAATC
12	D3S1358	AATCAACAGAGGCTTGCATG
13	D5S818	GGTGATTTTCCTCTTTGGTATCC
14	D5S818	AGTTTACAACATTTGTATCTTTATCTGTATC
15	D7S820	ATGTTGGTCAGGCTGACTATG
16	D7S820	GATTCCACATTTATCCTCATTGAC
17	D8S1179	GTATTTTCATGTGTACATTCGTATCTATC
18	D8S1179	GCCTTAATTTATTTACCTATCCTGTAG
19	D10S1248	AAAGCAAACCTGAGCATTAGC
20	D10S1248	GTGAGAAACCATACTTTTCCCT
21	D12S391	CTGGTGAAGGAAGAAAAGAGAAT
22	D12S391	TTGGCTTTTAGACCTGGACTGA
23	D13S317	ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA
24	D13S317	GGCAGCCCAAAAAGACAGA
25	D16S539	TCAATACAGACAGACAGACAGGTGGAT
26	D16S539	GTTTGTGTGTGCATCTGTAAGCATGTATC
27	D18S51	CACTTCACTCTGAGTGACAAAT
28	D18S51	TCTGGTGTGTGGAGATGTCTTACAATA
29	D19S433	GCAAAAAGCTATAATTGTACCACT
30	D19S433	AGTTCTTTAGCAGTGATTTCTGATATT
31	D21S11	ATATGTGAGTCAATCCCCAAG
32	D21S11	TGTATTAGTCAATGTTCTCCAGAGAC
33	D22S1045	ATCGTTGGAATCCCCAAACTG
34	D22S1045	GTGACCTCAGGCAAGTCCCTA
35	FGA	CCATAGGTTTTGAACTCACAGATTAA
36	FGA	GCCAGCAAAAAGAAAGGAAGA
37	Penta B	CTTGAAGCTGGGAGACGGAAAGT
38	Penta B	AGCTCTTACTTTGGGTGGGC
39	Penta C	CTTGCAGGAGACAGGGTTTATA
40	Penta C	CGCCACTGCTACAAGAGAG
41	Penta D	GTGAGGCTGAAGTAGGATCAC
42	Penta D	GACACAAGTCCTTTTTTAGATATGTG
43	Penta E	GGGCGACTGAGCAAGACTCA

201311952

44	Penta E	GACATTTCTTATTTTCTCATATTGGTGG
45	SE33	TCTGTAATTCCAGCTCCTAGG
46	SE33	AGGTTTATATATATTTCTACAACATCTCC
47	TH01	GGCCTGTTCCCTCCCTTATTTCC
48	TH01	GAGTGCAGGTCACAGGGAAC
49	TPOX	GCACAGAACAGGCACTTAGG
50	TPOX	CCCCAACGCTCAAACGTGAGGTTG
51	vWA	TCCAAGTTGACTTGGCTGAG
52	vWA	CAGATGATAAATACATAGGATGGATG

## 序列表

<110> 美商網路生物有限公司

<120> 快速多重擴增 STR 基因座之方法及組合物

<130> NBS-007

<140> 101117168

<141> 2012/05/14

<150> US 61/485,459

<151> 2011/05/12

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成引子

<400> 1

ccctgggctc tgtaaagaa

19

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成引子

<400> 2

atcagagctt aaactgggaa gctg

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成引子

<400> 3

ccggaggtaa aggtgtctta aagt

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成引子

<400> 4

atttctgig tcagaccctg tt

22

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成引子

<400> 5 gcgcctggtc ttgtttat	19
<210> 6 <211> 25 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 6 agaaaatccc catataagtt caagc	25
<210> 7 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 7 caaaaccctg aaaatggcaa tt	22
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 8 agtgttcag cctacatccc	20
<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 9 cttcctccag ggtattaatg gg	22
<210> 10 <211> 24 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 10 acatcacaaa aatcttcact ctcc	24
<210> 11 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 合成引子	
<400> 11 ccccactgca gtccaatc	18

# 201311952

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 12  
aatcaacaga ggcttgcag 20

<210> 13  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 13  
ggatgatttc ctctttggta tcc 23

<210> 14  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 14  
agttacaac atttgtatct ttatctgtat c 31

<210> 15  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 15  
atgttggica ggctgactat g 21

<210> 16  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 16  
gattccacat ttatcctcat tgac 24

<210> 17  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 17  
gtatttcag tgtacattcg tatctatc 28

<210> 18  
<211> 27

<212> DNA	
<213> 人工合成引子	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 18	
gccttaattt atttacctat cctgtag	27
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 19	
aaagcaaacc tgagcattag c	21
<210> 20	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 20	
gtgagaaacc atactttttc cct	23
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 21	
ctggtgaagg aagaaaagag aat	23
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 22	
ttggctttta gacctggact ga	22
<210> 23	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 合成引子	
<400> 23	
attacagaag tctgggatgt ggagga	26
<210> 24	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工	

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 24

ggcagcccaa aaagacaga

19

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 25

tcaatacaga cagacagaca ggtggat

27

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 26

gtttgtgtgt gcatctgtaa gcatgtatc

29

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 27

cacttcactc tgagtgacaa at

22

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 28

tctggtgtgt ggagatgtct tacaata

27

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

&lt;400&gt; 29

gcaaaaagct ataattgtac cact

24

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成引子

<400> 30  
 agttctttag cagtgatttc tgatatt 27

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 31  
 atatgtgagt caattcccca ag 22

<210> 32  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 32  
 tgtattagtc aatgttctcc agagac 26

<210> 33  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 33  
 atcgttggaa ttccccaac tg 22

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 34  
 gtgacctcag gcaagtcctt a 21

<210> 35  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 35  
 ccataggttt tgaactcaca gattaa 26

<210> 36  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成引子

<400> 36  
 gccagcaaaa aagaaaggaa ga 22

# 201311952

<210> 37  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 37  
cttgaagctg ggagacggaa agt 23

<210> 38  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 38  
agctctctta ctttgggtgg gc 22

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 39  
cttgcaggag acagggttta ta 22

<210> 40  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 40  
cgccactgct acaagagag 19

<210> 41  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 41  
gtgaggctga agtaggatca c 21

<210> 42  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 42  
gacacaagtc cttttttaga tatgtg 26

<210> 43  
<211> 20

<212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 43  
 gggcgactga gcaagactca 20

<210> 44  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 44  
 gacatttctt attttctcat attggtgg 28

<210> 45  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 45  
 tctgtaattc cagctcctag g 21

<210> 46  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 46  
 aggtttatat atatttctac aacatctcc 29

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 47  
 ggctgttcc tcccttattt cc 22

<210> 48  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 合成引子  
 <400> 48  
 gagtgcaggt cacaggggaac 20

<210> 49  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 49  
gcacagaaca ggcacttagg 20

<210> 50  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 50  
ccccaacgct caaacgtgag gttg 24

<210> 51  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工

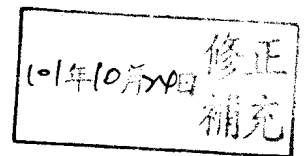
<220>  
<223> 合成引子

<400> 51  
tccaagtga cttggctgag 20

<210> 52  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成引子

<400> 52  
cagaatgataa atacatagga tggatg 26

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101117168

※申請日：101.5.14

※IPC 分類：C40B 50/06 (2006.01)  
C40B 60/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

快速多重擴增STR基因座之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR RAPID MULTIPLEX  
AMPLIFICATION OF STR LOCI

○ 二、中文發明摘要：

本發明提供多重聚合酶鏈反應(PCR)擴增短串聯重複序列(short tandem repeat, STR)基因座之方法，其可用於自靶核酸快速產生高特異性STR圖譜(profile)。所得STR圖譜可用於法律執行、國土安全、軍事、情報及親子測試應用中之人類鑒定目的。

三、英文發明摘要：

○ Provided are methods for multiplex polymerase chain reaction (PCR) amplification of short tandem repeat (STR) loci that can be used to rapidly generate a highly specific STR profile from target nucleic acids. The resulting STR profiles are useful for human identification purposes in law enforcement, homeland security, military, intelligence, and paternity testing applications.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

- (a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少6個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且其中所得STR多重體(multiplex)之多重密度等於或大於3.20；

- (b) 在一個反應室中使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增以產生經擴增之核酸產物；及

- (c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

2. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

- (a) 在一種溶液中使該試樣與STR基因座之至少6個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且其中使用至少6種不同螢光染料標記，且其中所得STR多重體之多重密度等於或大於2.0；

- (b) 在一個反應室中使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增以產生經擴增之核酸產物；及

- (c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

3. 如請求項2之方法，其中該所得STR多重體之多重密度等於或大於3.2。

4. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

- (a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少6個不同引

子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且其中使用至少6種不同螢光染料標記，且其中所得STR多重體之STR基因座大小範圍總和大於1044；

(b) 在一個反應室中使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增以產生經擴增之核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

5. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少16個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少16個基因座以產生至少16種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

6. 如請求項5之方法，其進一步包含用於性別鑒定之標記物。

7. 如請求項5之方法，其中在小於約2小時內產生STR圖譜(profile)。

8. 如請求項5之方法，其中在微流體生物晶片中產生該STR圖譜。

9. 如請求項5之方法，其中在完全整合微流體生物晶片中產生該STR圖譜。

10. 如請求項5之方法，其中該檢測方法係藉由質譜分光光度計。

11. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少21個STR基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座係由以下組成之群：D3S1358、D19S433、D2S1338、D22S1045、Penta B、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D16S539、vWFA31、D21S11、D12S391、牙釉蛋白(amelogenin)、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、D8S1179、FGA、SE33、DYS391、D6S1043、DYS439、DYS389II、DYS19、DYS392、DYS393、DYS389I、DYS390、DYS385a、DYS385b、DYS437及DYS438，且其中利用7種或更多種不同標記來標記各該等基因座之各引子對之一個成員。

12. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少16個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之15個基因座係由以下組成之群：D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179，

且該多個中至少1個STR基因座係選自由以下組成之群：SE33、Penta C、Penta D、Penta E、D5S818、

D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、DYS391及D6S1043，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

13. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

- a) 提供至少16個基因座；
- b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

且其中該等STR基因座中之15個基因座係由以下組成之群：D3S1358、D19S433、D2S1338、TH01、D18S51、D1S1656、D10S1248、D2S441、D16S539、vWA、D21S11、D12S391、D22S1045、FGA、D8S1179，及至少1個另外STR基因座，其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

14. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

- a) 提供至少18個基因座；
- b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之5個基因座係D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11及FGA

且該多個中至少13個STR基因座係選自由以下組成之群：D19S433、D2S1338、D16S539、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391、D6S1043、TH01及

vWA，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

15. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少15個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之5個基因座係D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11及FGA

且該多個中至少10個STR基因座係選自由以下組成之群：D19S433、D2S1338、D16S539、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391、D6S1043、TH01及vWA，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

16. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少21個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之5個基因座係D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11及FGA

且該多個中至少16個STR基因座係選自由以下組成之群：D19S433、D2S1338、D16S539、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta

E、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391、D6S1043、TH01及vWA，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

17. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少23個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之5個基因座係D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11及FGA

且該多個中至少18個STR基因座係選自由以下組成之群：D19S433、D2S1338、D16S539、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391、D6S1043、TH01及vWA，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

18. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少18個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中該等STR基因座中之至少1個基因座係由以下組成之群：DYS19、DYS378I、DYS389II、DYS390、DYS391、DYS392、DYS393、DYS385a/b、DYS437、DYS438、

DYS439、DYS472、DYS476、DYS480、DYS481、  
DYS485、DYS487、DYS488、DYS490、DYS491、  
DYS492、DYS494、DYS495、DYS497、DYS505、  
DYS508、DYS511、DYS522、DYS525、DYS530、  
DYS531、DYS533、DYS537、DYS540、DYS549、  
DYS554、DYS556、DYS565、DYS567、DYS568、  
DYS569、DYS570、DYS572、DYS573、DYS575、  
DYS576、DYS578、DYS579、DYS580、DYS583、  
DYS589、DYS590、DYS594、DYS617、DYS618、  
DYS636、DYS640、DYS641或DYS643

且其中使用6種或更多種不同標記來標記該等擴增基因座。

19. 如請求項12、14、16、18、24或29之方法，其進一步包含至少一個選自由以下組成之群之另外STR標記物：體染色體STRs、微型-STRs、Y-STRs及X-STRs。

20. 一種用於多重擴增STR基因座之系統，其包含：

(a) 生物晶片，其包含在至少一種溶液中試樣與STR基因座之至少6個不同引子對，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且其中所得STR多重體之多重密度等於或大於3.20；及

(b) 擴增系統，其用於使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增；及

(c) 檢測系統，其包含能夠檢測該至少6種不同螢光標記之雷射。

21. 一種用於多重擴增核酸基因座之系統，其包含：

(a) 生物晶片，其包含在至少一種溶液中試樣與STR基因座之至少6個不同引子對，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且其中使用至少6種不同螢光染料標記，且其中所得STR多重體之STR基因座大小範圍總和大於1044；

(b) 擴增系統，其用於使用該至少6個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增；及

(c) 檢測系統，其包含能夠檢測該至少6種不同螢光標記之雷射。

22. 一種用於多重擴增STR基因座之系統，其包含：

(a) 生物晶片，其包含在至少一種溶液中試樣與STR基因座之至少16個不同引子對，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 擴增系統，其用於使用該至少16個引子對藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增；及

(c) 檢測系統，其包含能夠檢測該至少6種不同螢光標記之雷射。

23. 一種多重擴增包含多個基因座之DNA分子之方法，該方法包含：

a) 提供至少35個基因座；

b) 在單一擴增反應中擴增該等基因座

其中至少一個STR基因座係選自由以下組成之群：

D3S1358、D8S1179、D18S51、D21S11、FGA、TH01及vWA、D19S433、D2S1338、D16S539、Penta D、D5S818、D13S317、D7S820、TPOX、CSF1PO、Penta E、SE33、D1S1656、D10S1248、D2S441、Penta C、D12S391、D22S1045、DYS391及D6S1043，且其中利用6種或更多種不同標記來標記各基因座之各引子對之一個成員。

24. 一種用於檢測含有至少一個核酸之試樣中至少3種SNP多型性之存在的方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與至少3種不同寡核苷酸接觸，

(b) 使用至少6種不同螢光標記來產生至少6種不同螢光信號，及

(c) 藉由大小、序列或其他特性來分離經標記產物，及藉由雷射誘發之螢光檢測含有個別螢光信號之產物。

25. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少18個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少16個基因座以產生至少16種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

26. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少21個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少16個基因座以產生至少16種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

27. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少22個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少16個基因座以產生至少16種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

28. 一種自含有核酸之試樣多重擴增STR基因座之方法，其包含：

(a) 在溶液中使該試樣與STR基因座之至少23個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少6種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少16個基因座以產生至少16種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

29. 一種自含有核酸之試樣多重擴增至至少7個基因座之方法，其包含：

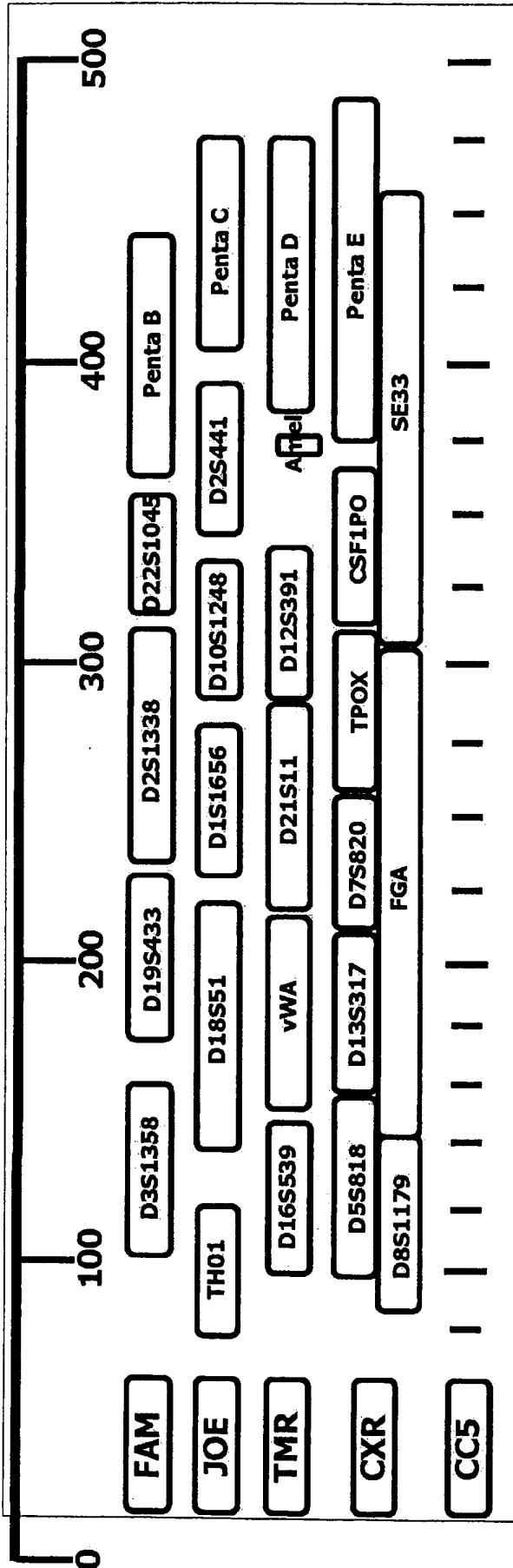
(a) 在溶液中使該試樣與該等基因座之至少7個不同引子對接觸，其中各引子對中之至少一個引子經螢光染料標記，且使用至少7種不同螢光染料標記；及

(b) 在一個反應室中藉由聚合酶鏈反應(PCR)同時擴增該至少7個基因座以產生至少7種擴增核酸產物；及

(c) 藉由雷射誘發之螢光檢測該等核酸產物。

八、圖式：

實例 1  
圖 1



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
26 基因座 - 5 染料	1487	411 鹼基	3.62

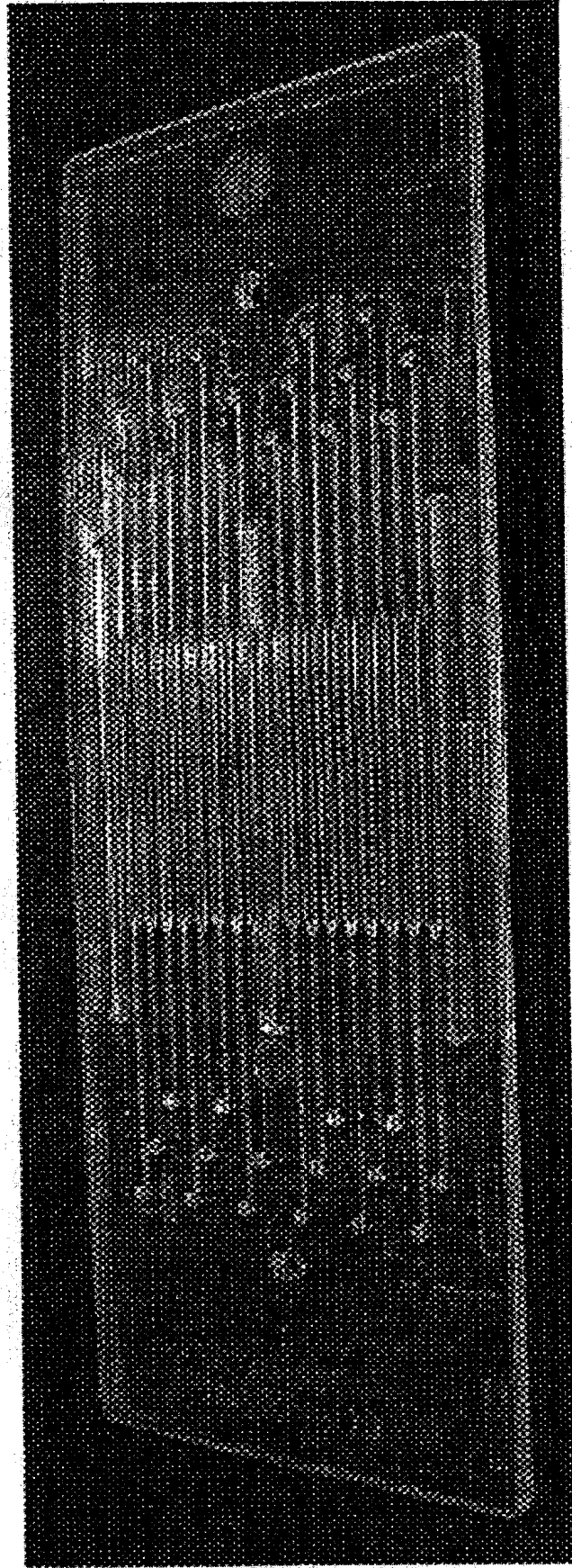
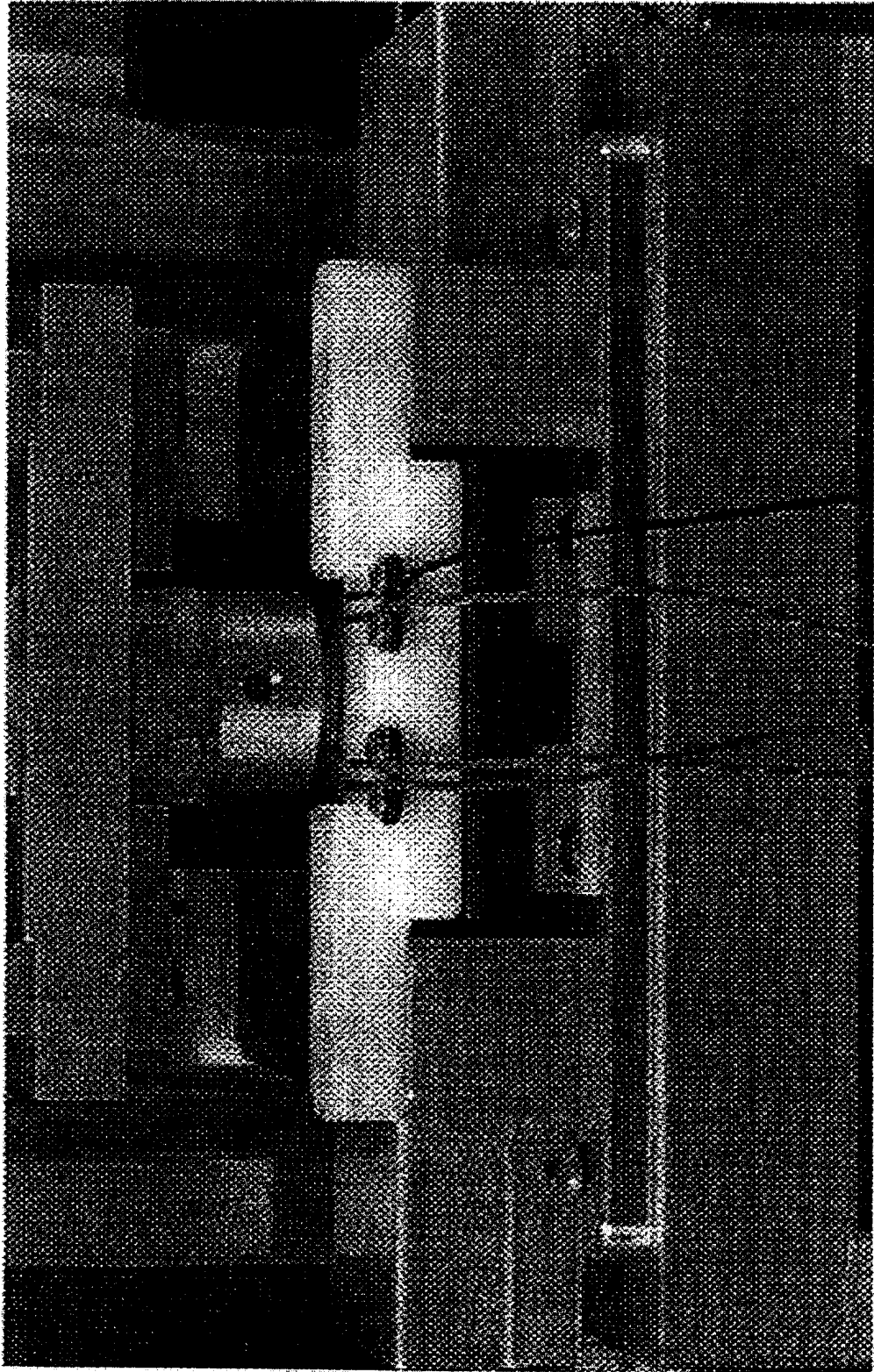
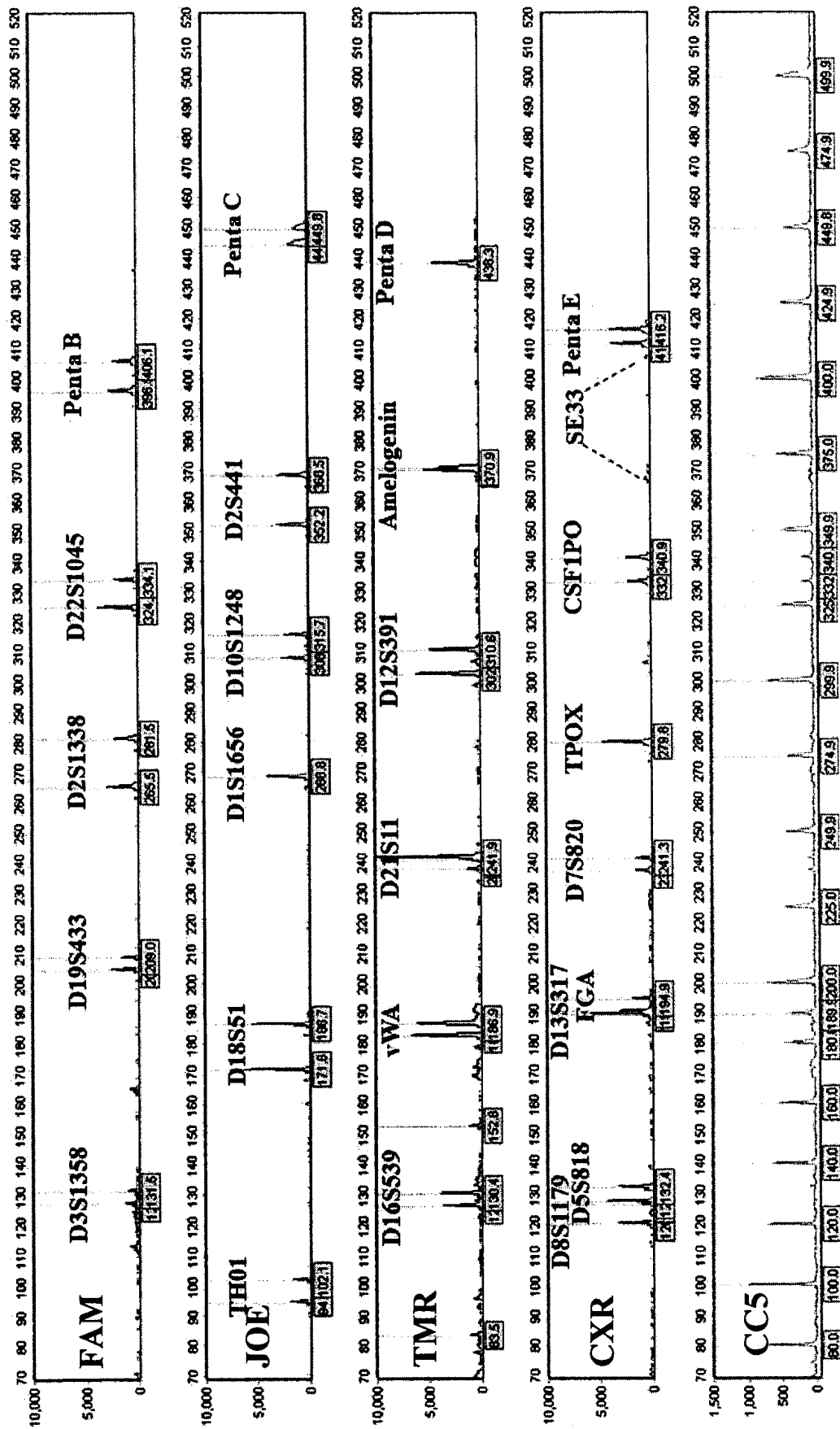


圖 2A

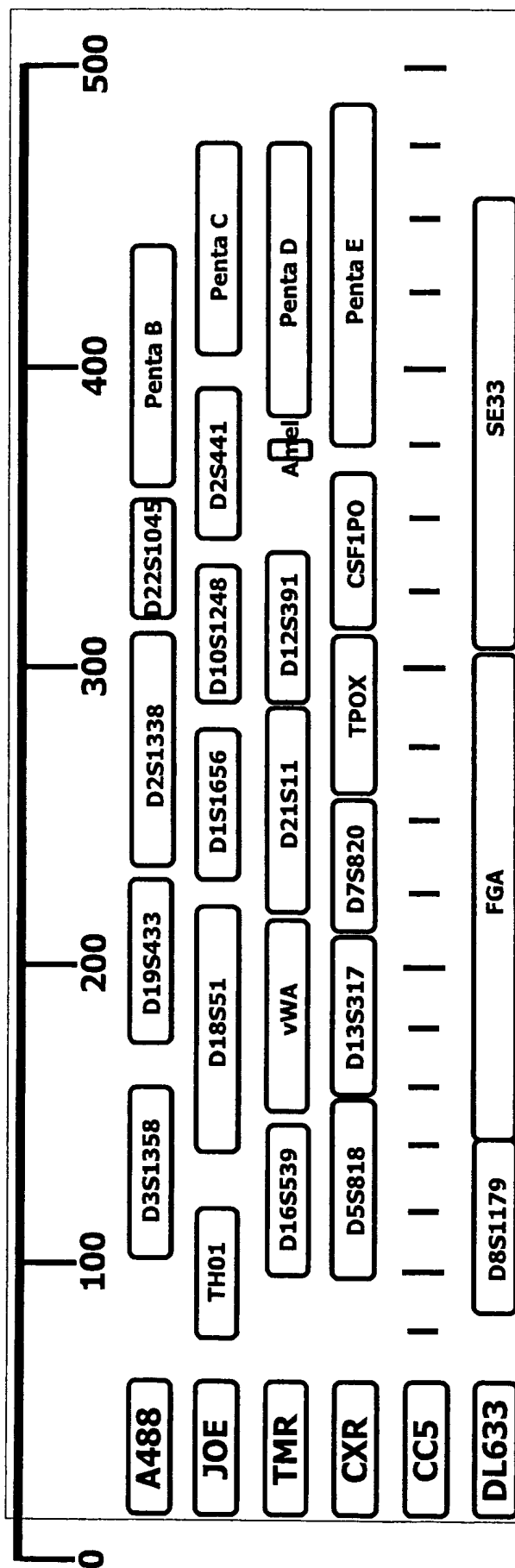
圖 2B



實例 1  
圖 3



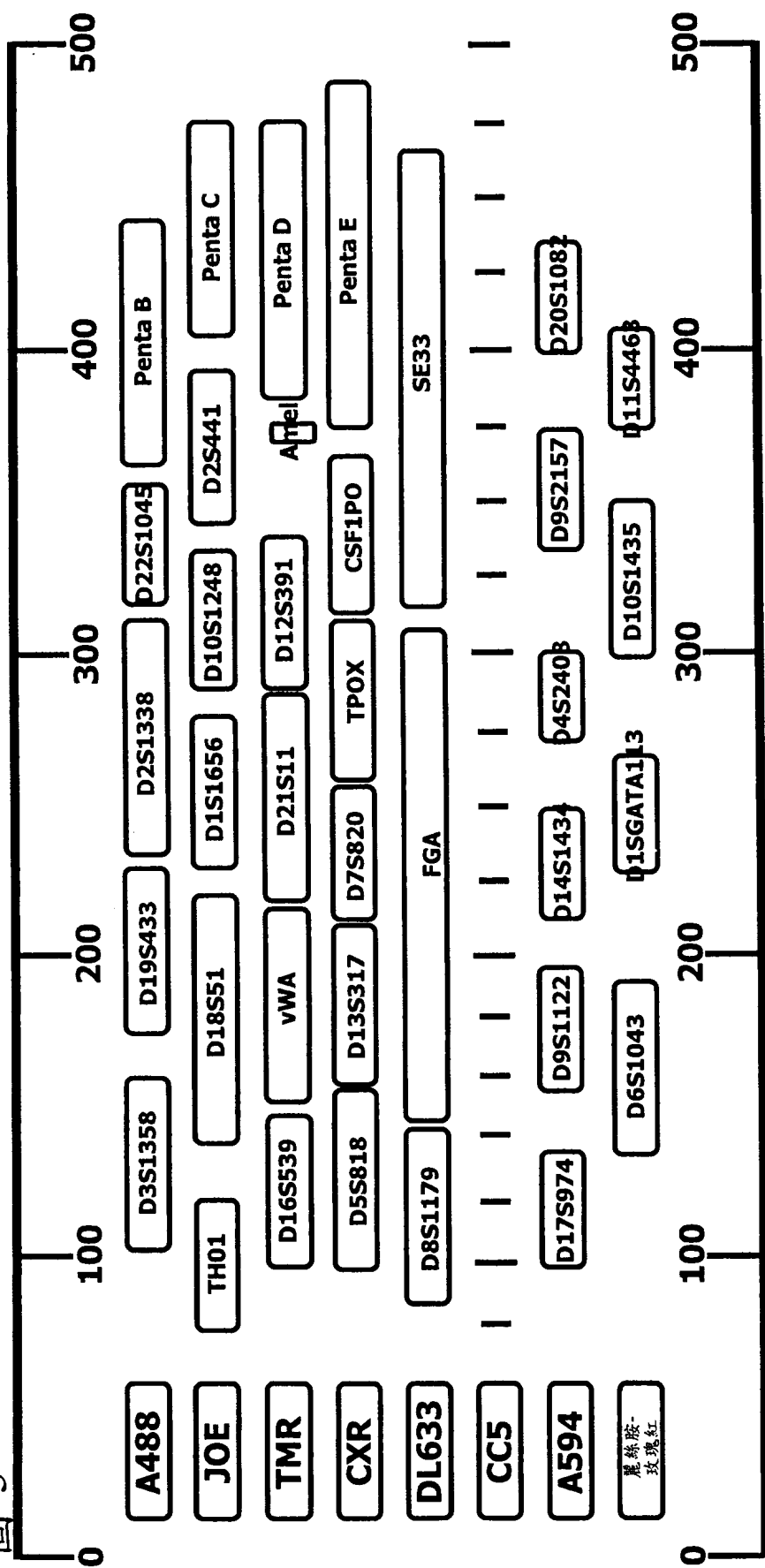
實例 2  
圖 4



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
26 基因座 - 6 染料	1487	411 鹼基	3.62

實例 3

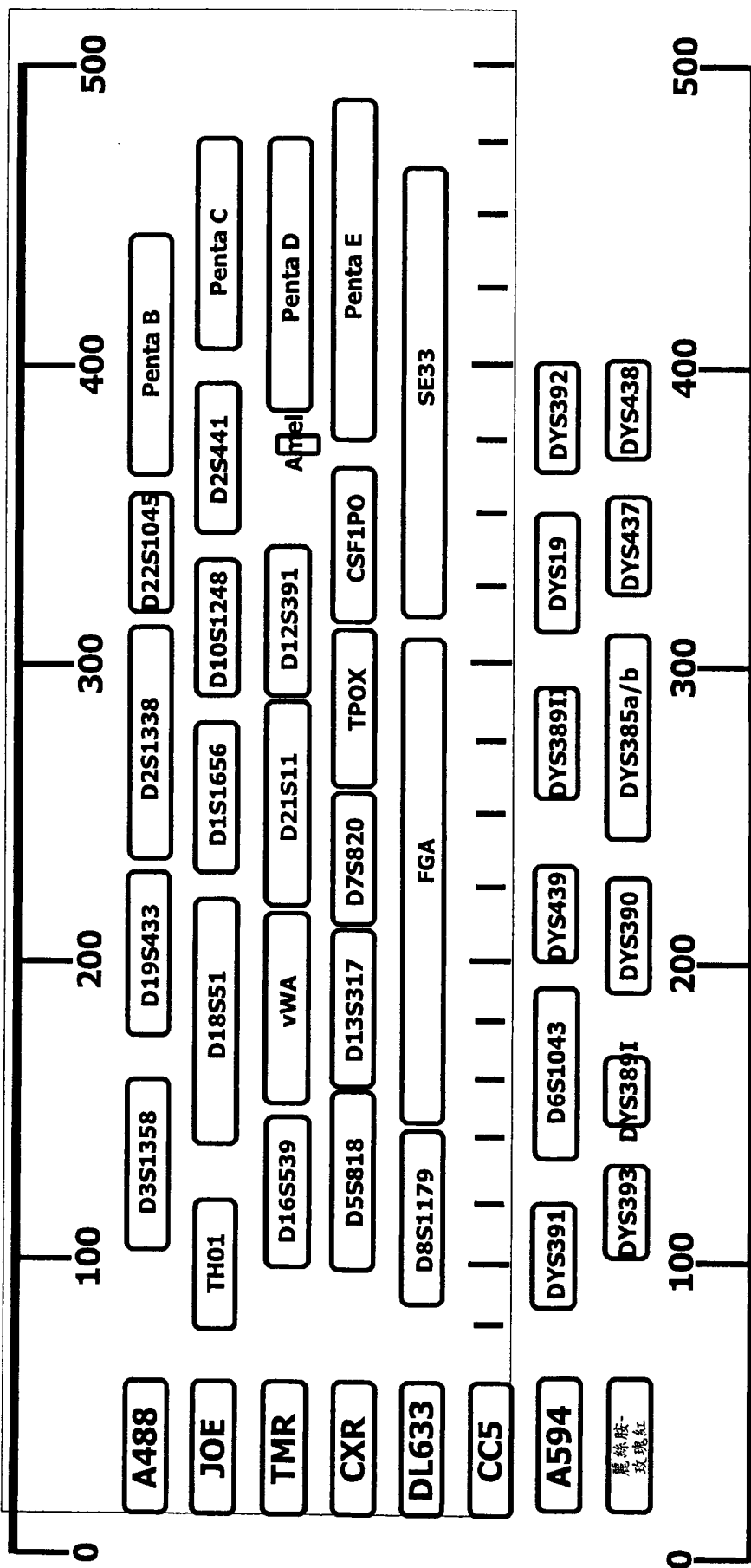
圖 5



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
36 基因座 - 8 染料	1907 (估計)	411 鹼基	4.64 (估計)

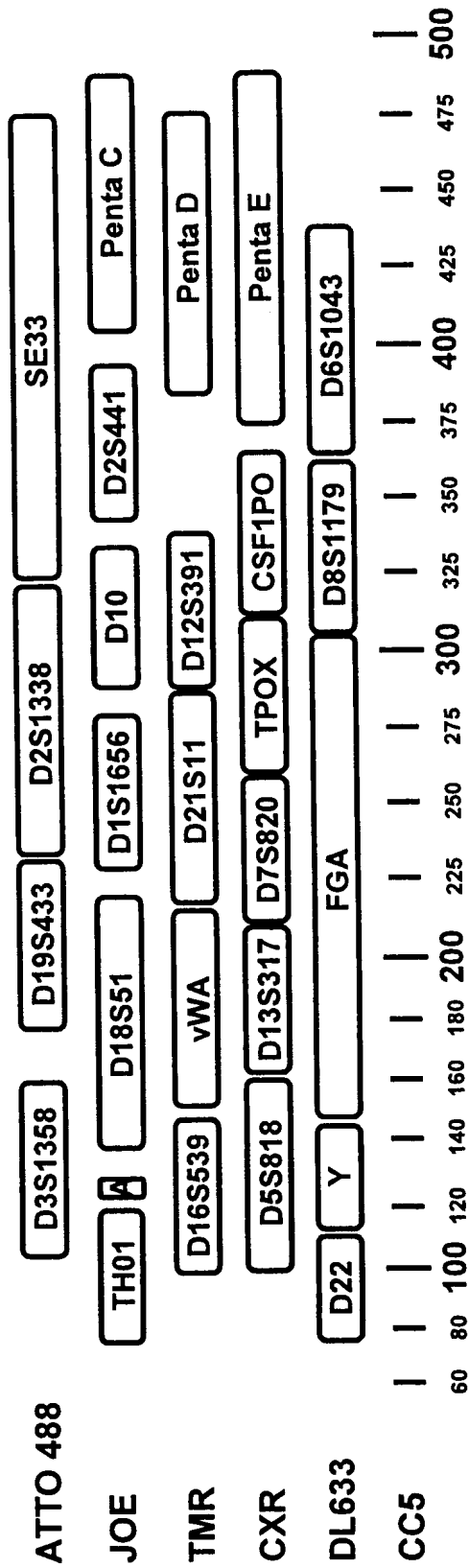
實例 4

圖 6



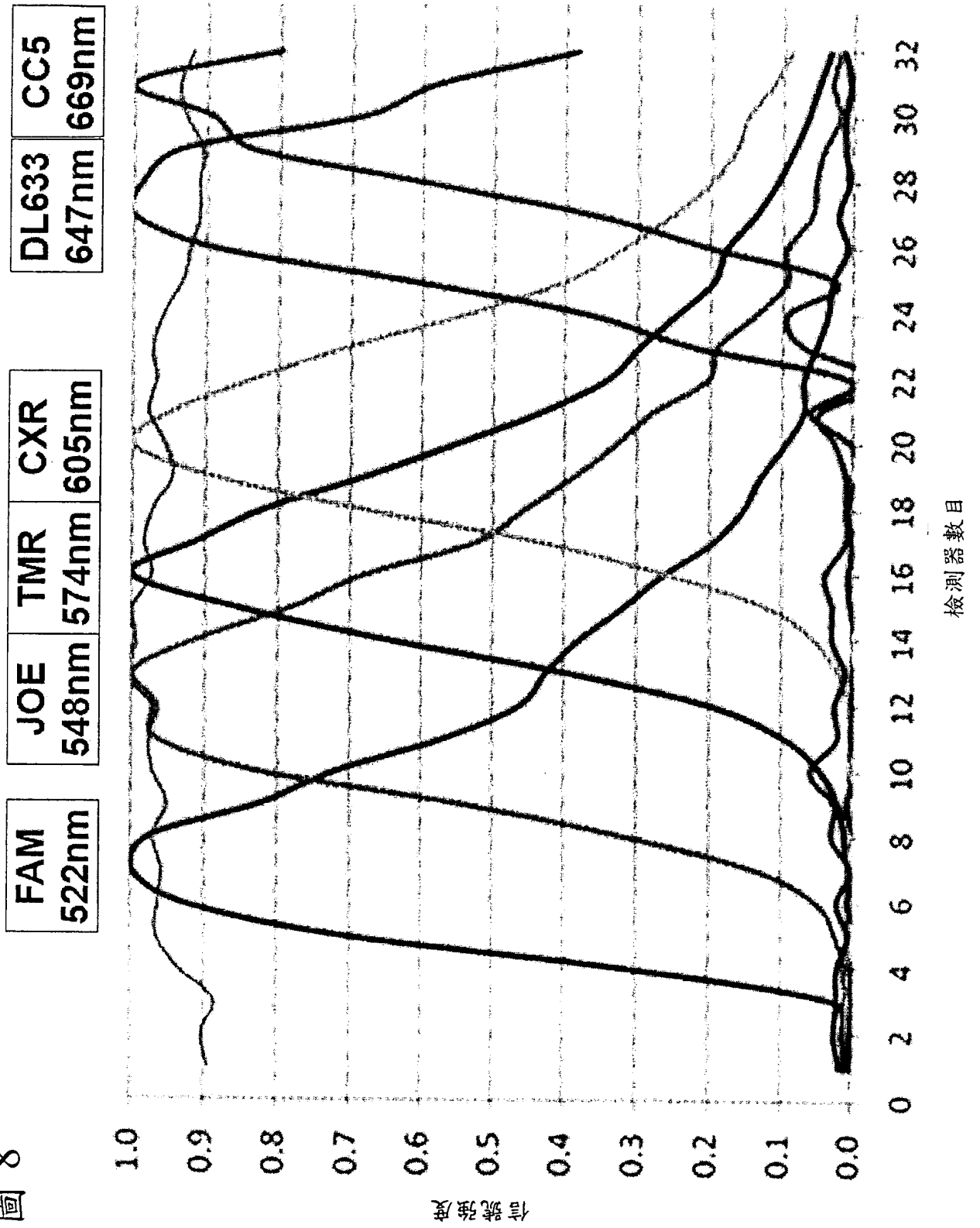
多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
38 基因座 - 8 染料	1976 (估計)	411 b 鹼基	4.81 (估計)

實例 5  
圖 7



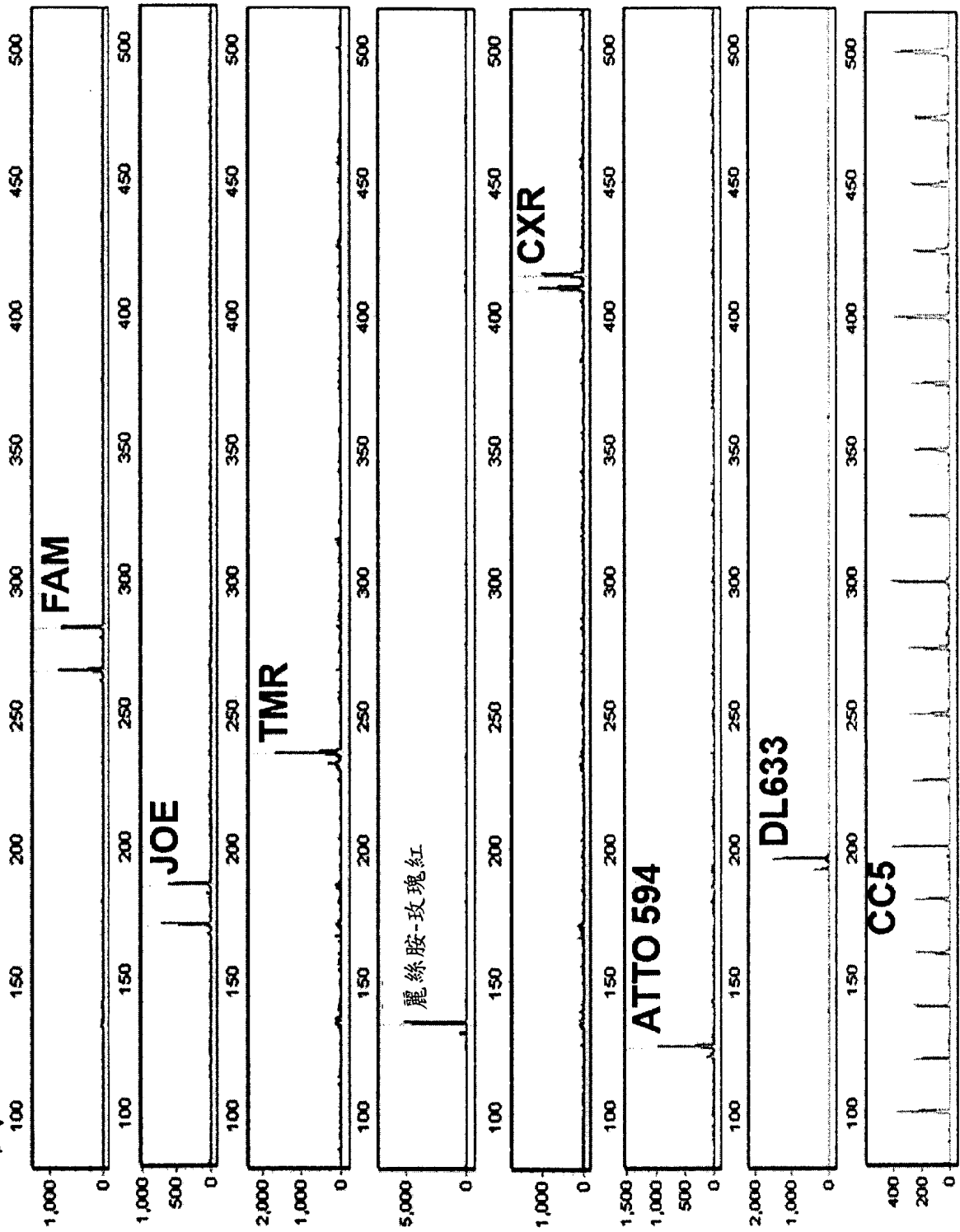
多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
27 基因座 - 6 染料	1509	387 鹼基	3.90

實例 7  
圖 8

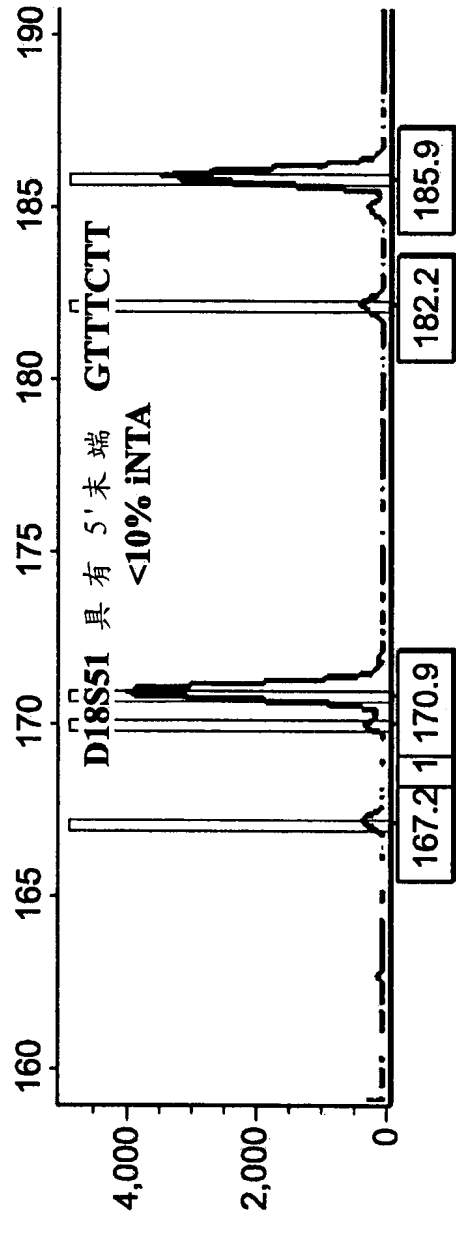
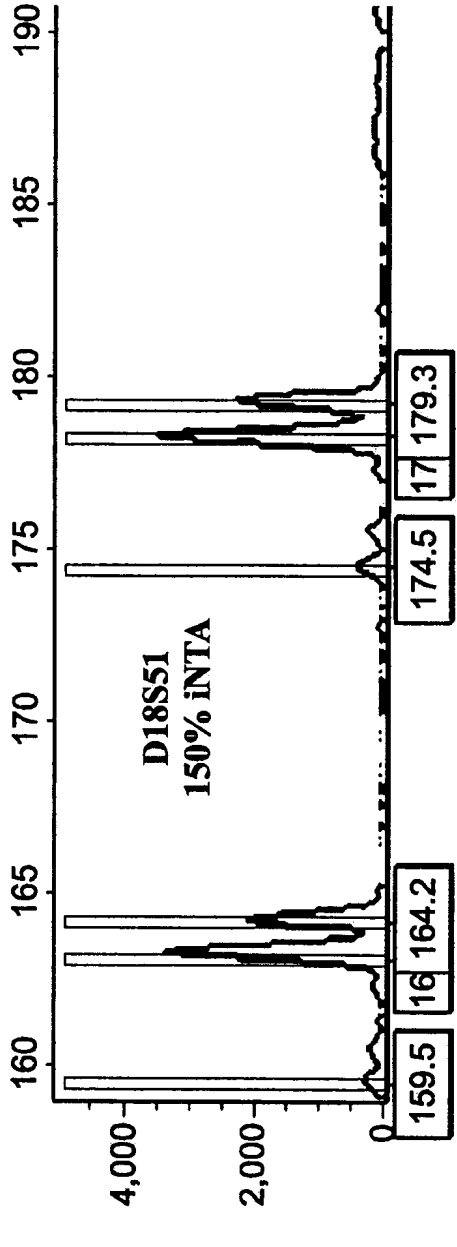


實例 8

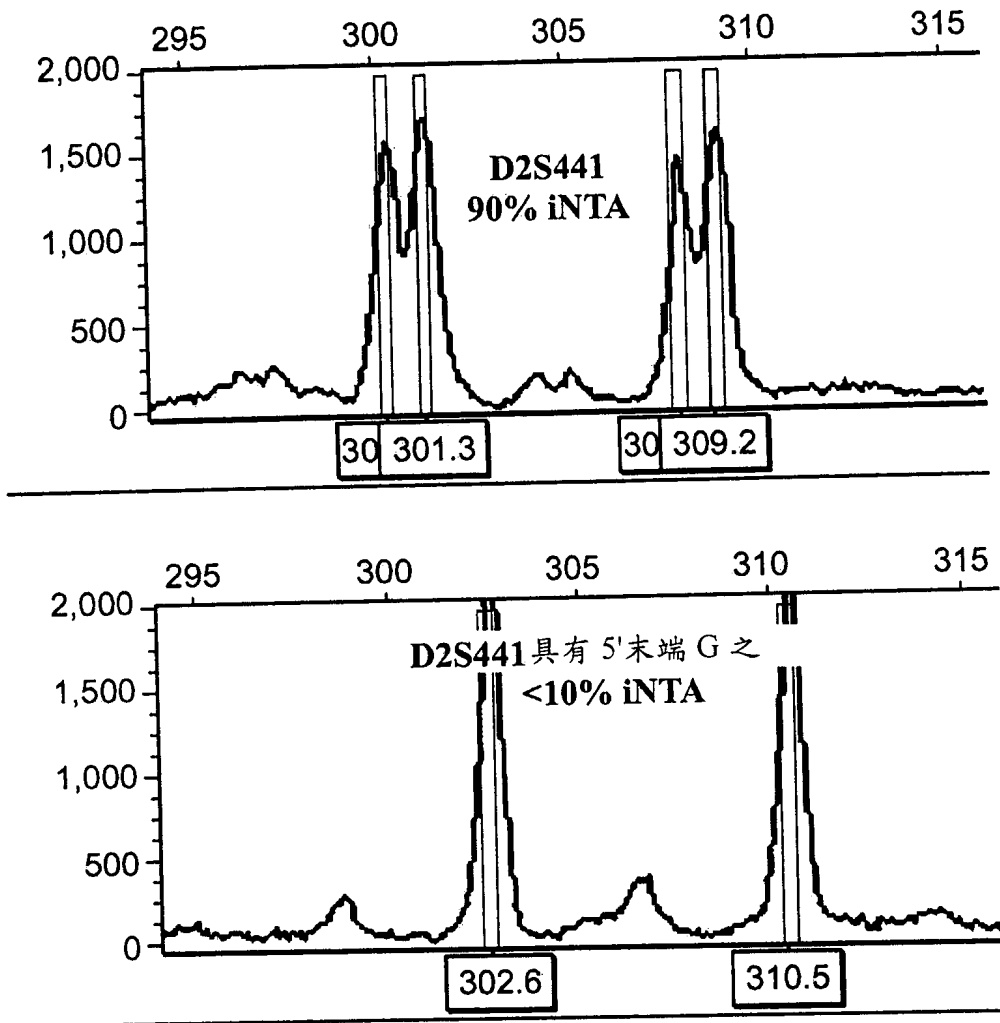
圖 9



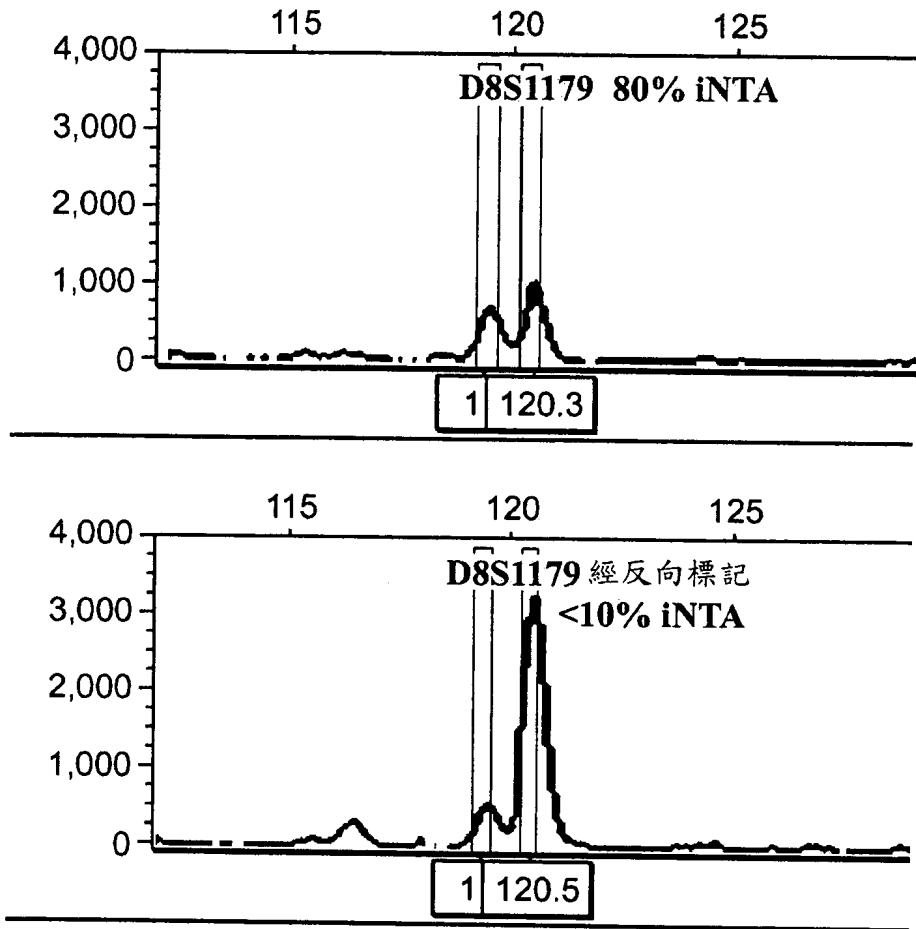
實例 10  
圖 10A



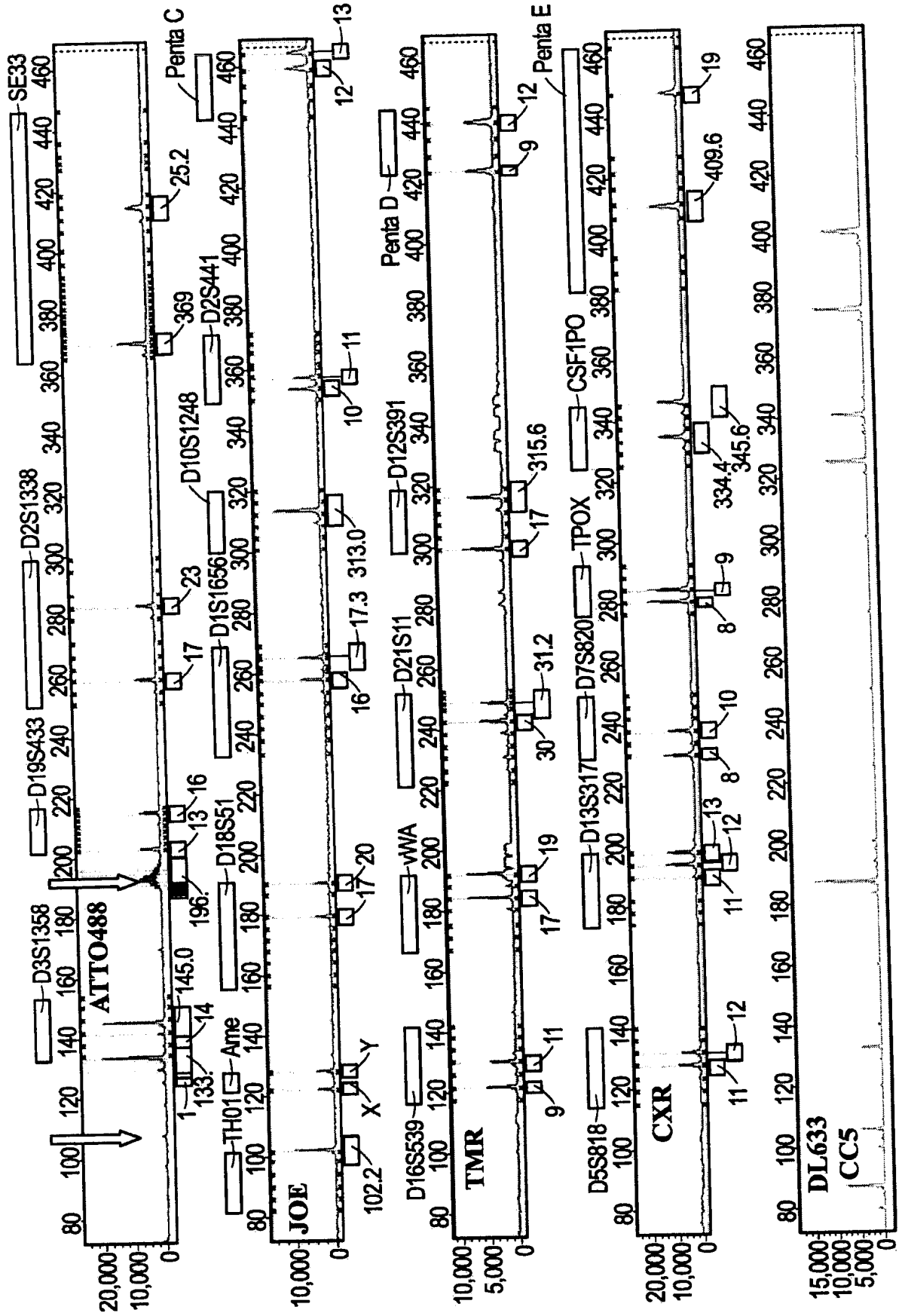
實例 10  
圖 10B



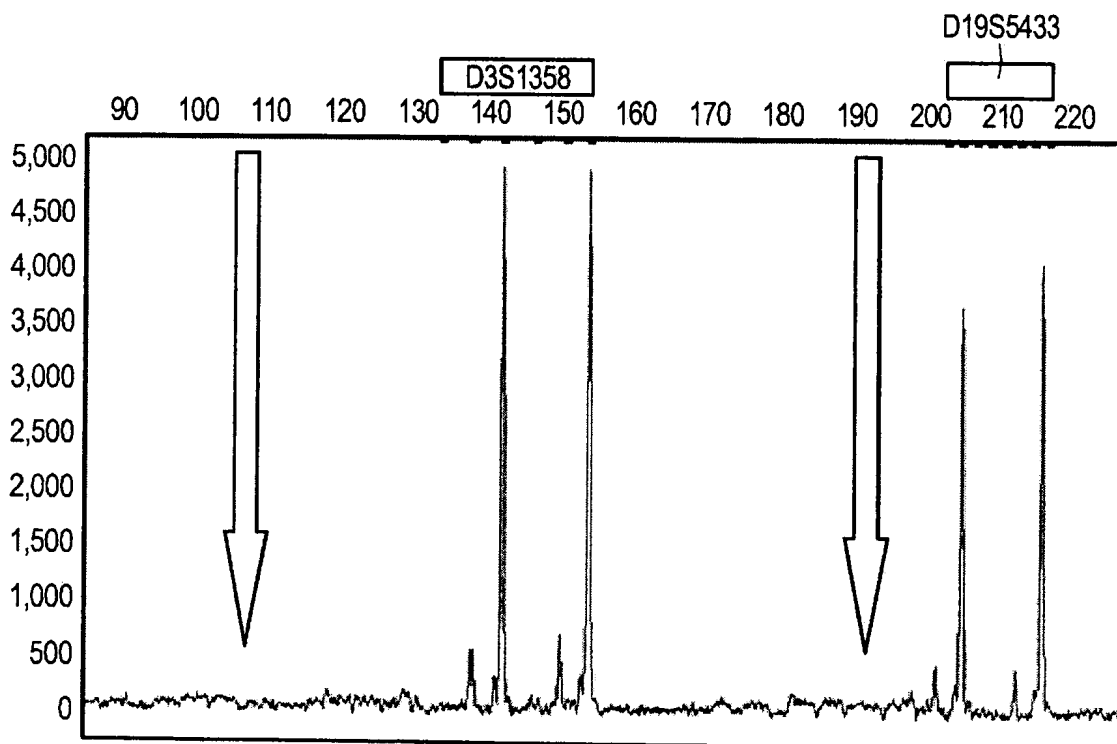
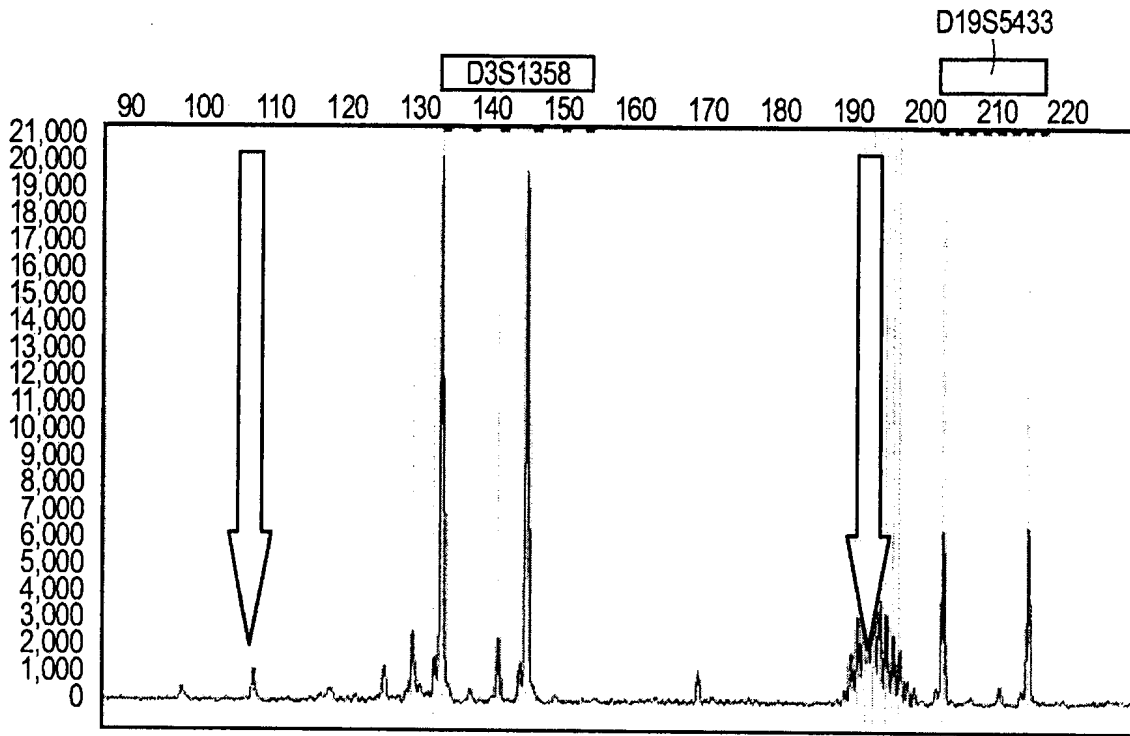
實例 10  
圖 10C



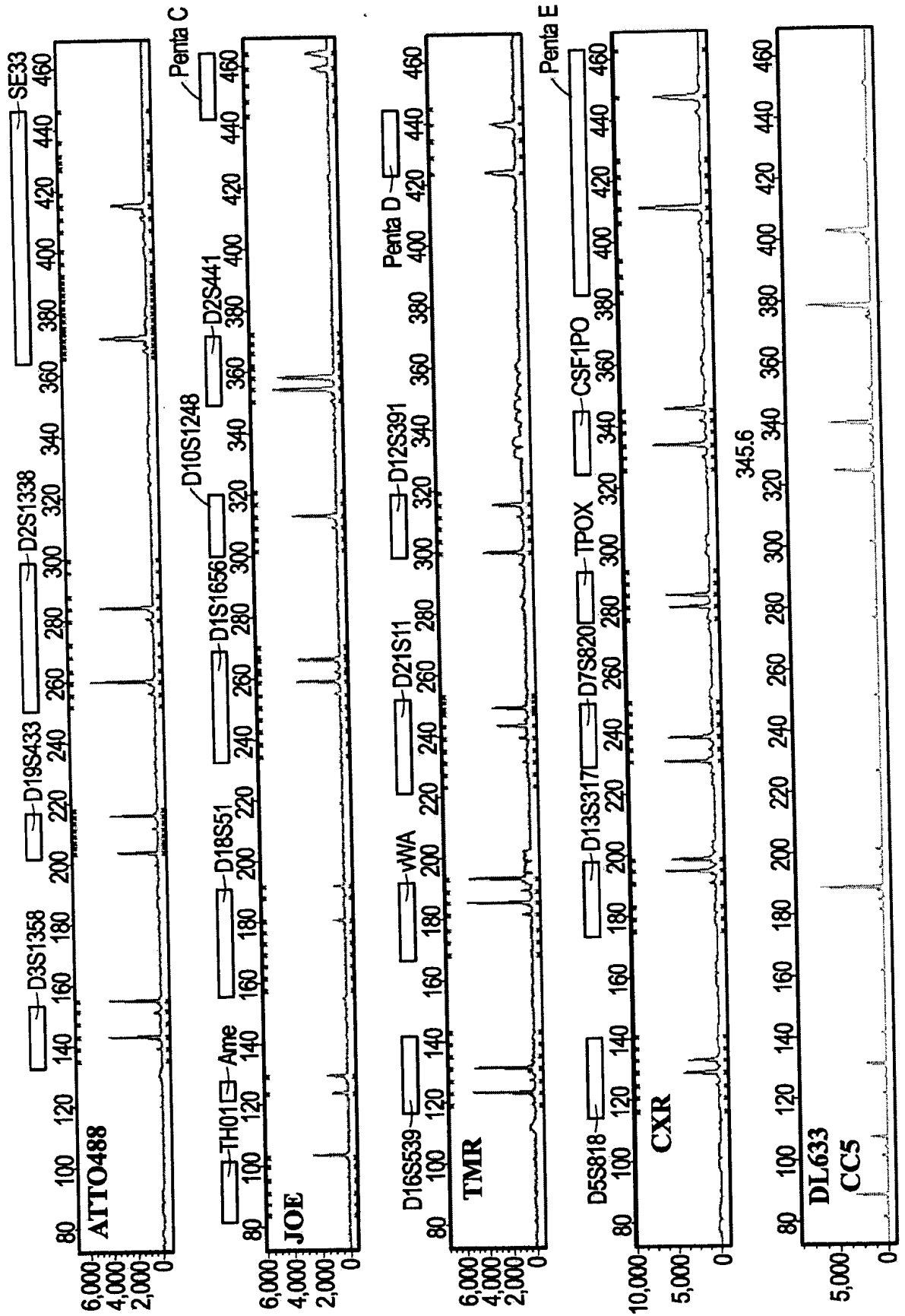
實例 11 圖 11A



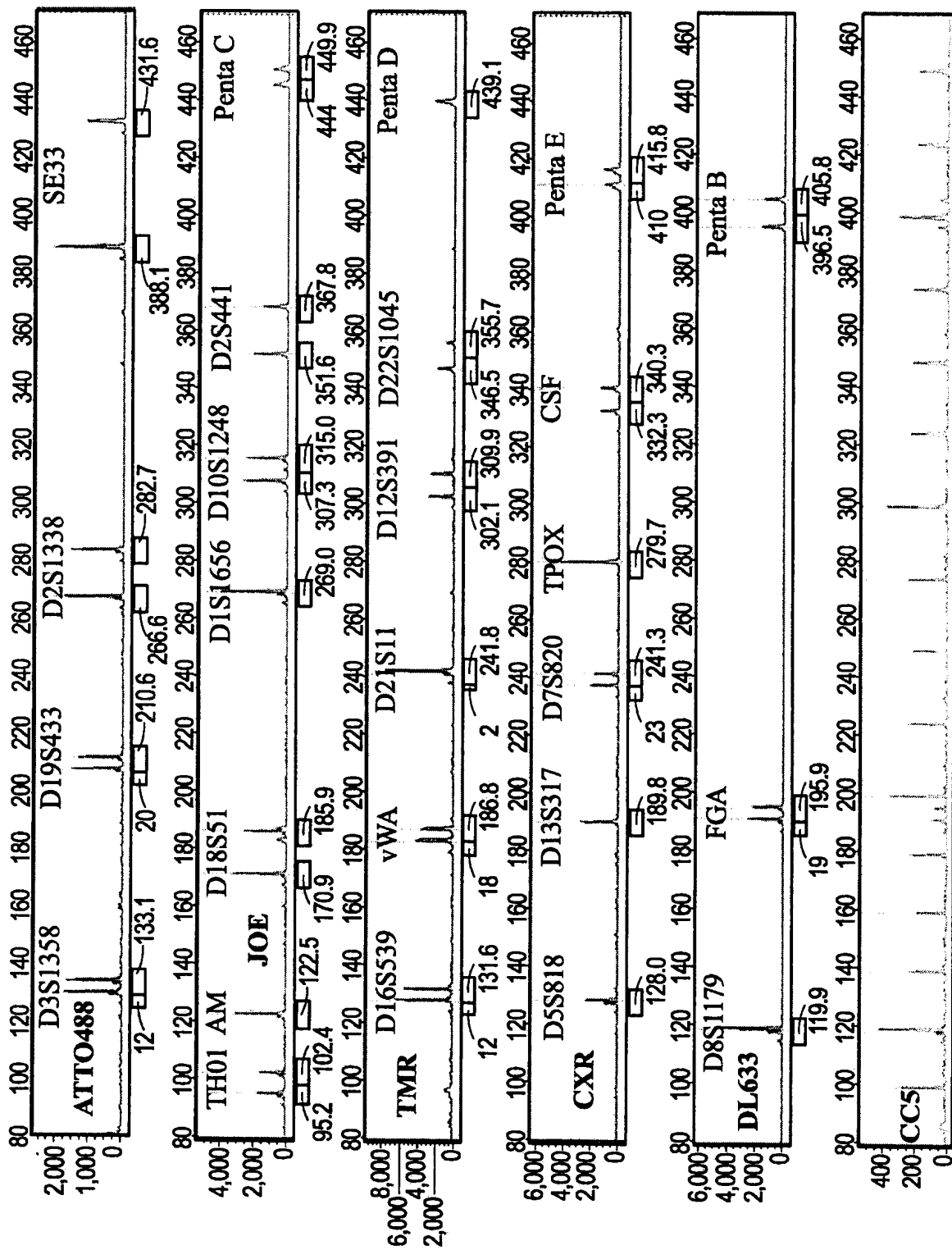
實例 11 圖 11B



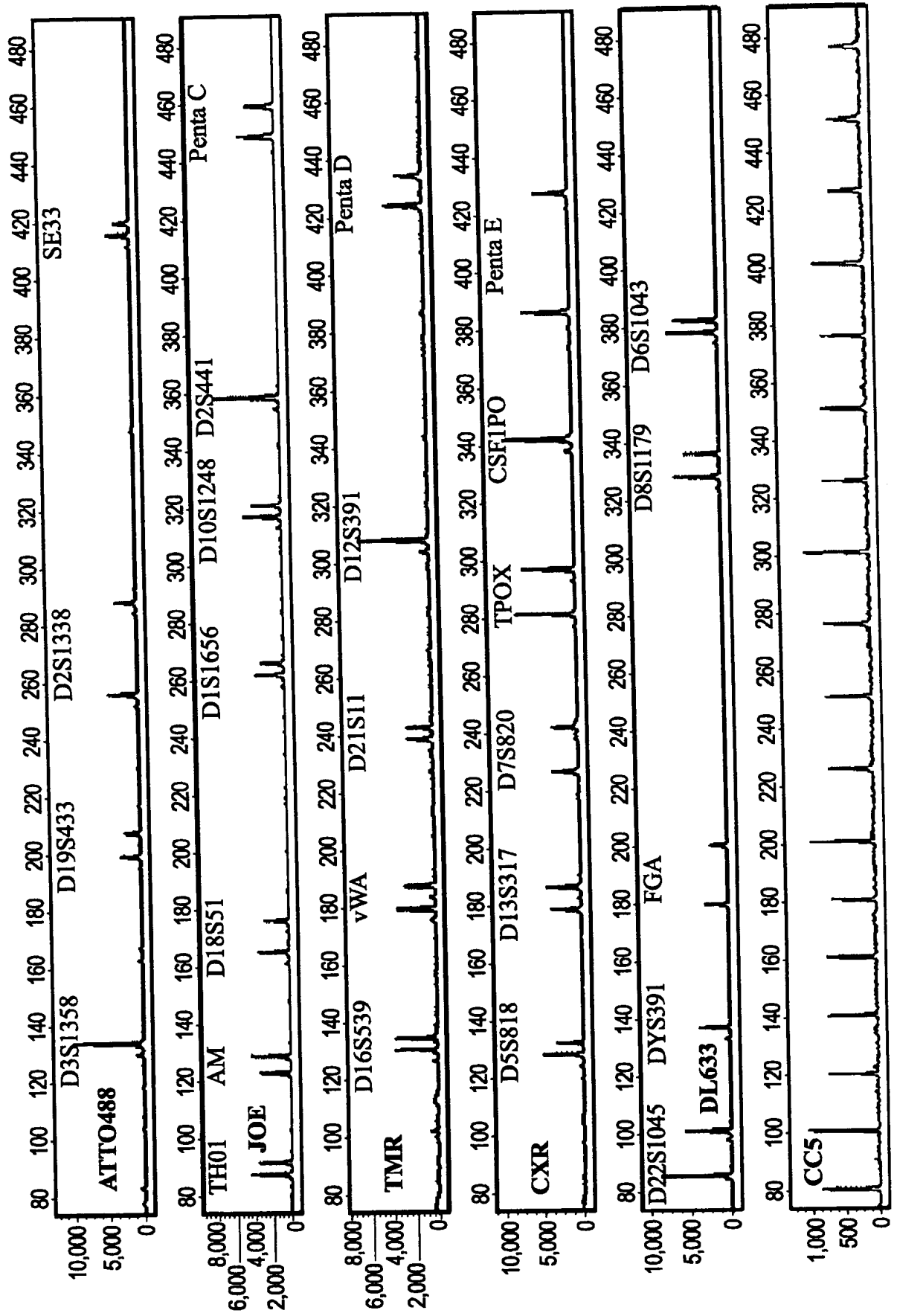
實例 11 圖 11C



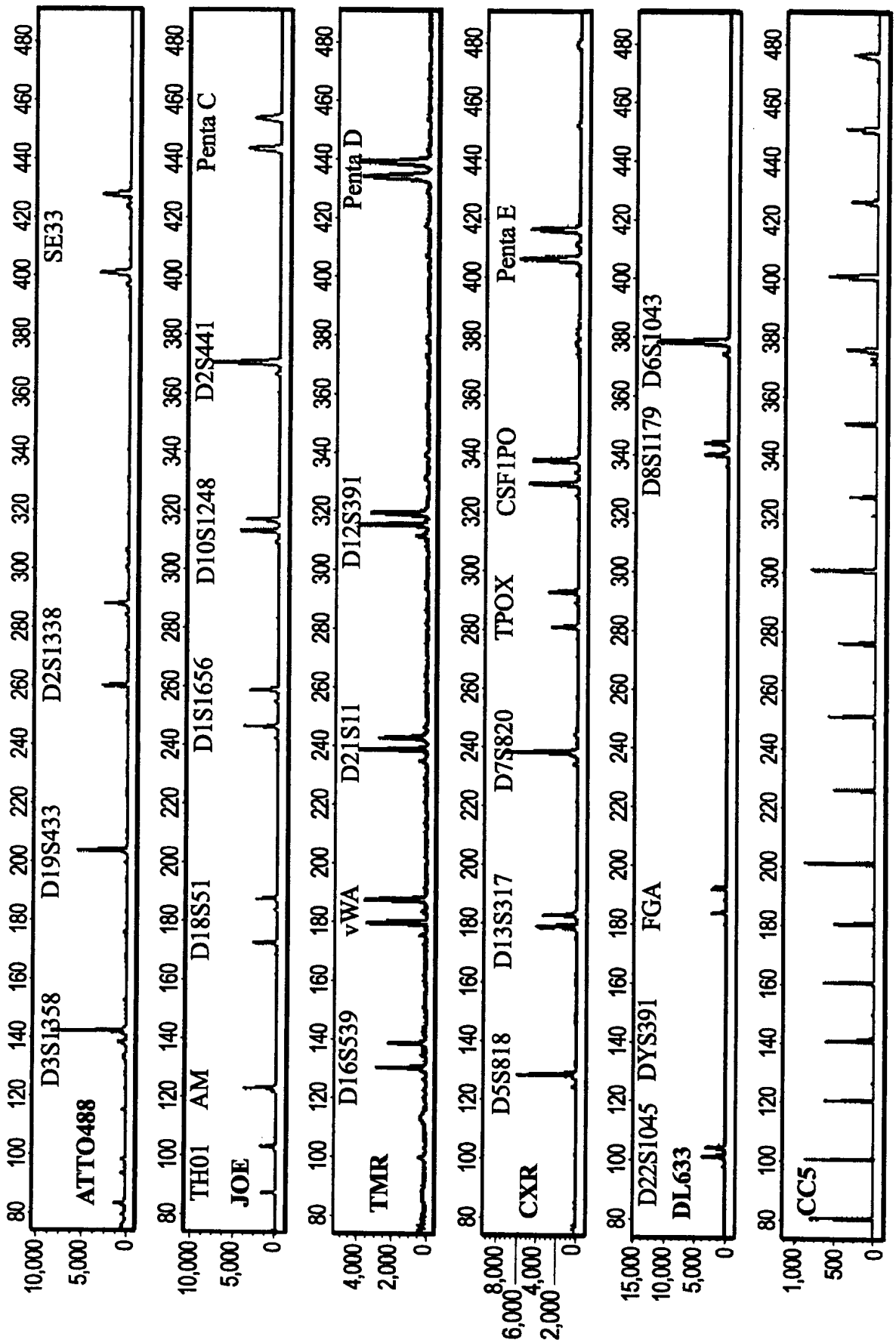
實例 12 圖 12



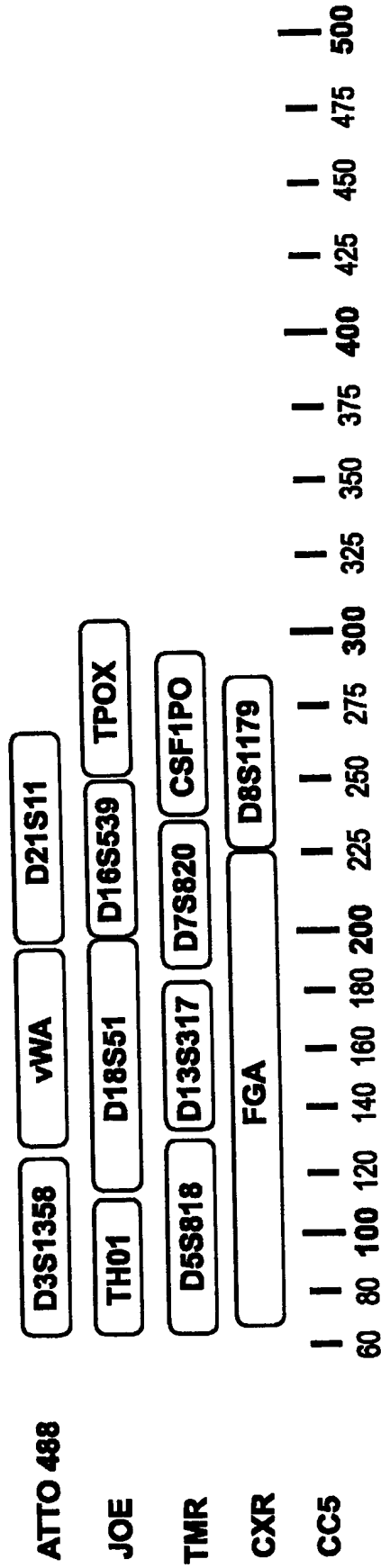
實例 13 圖 13A



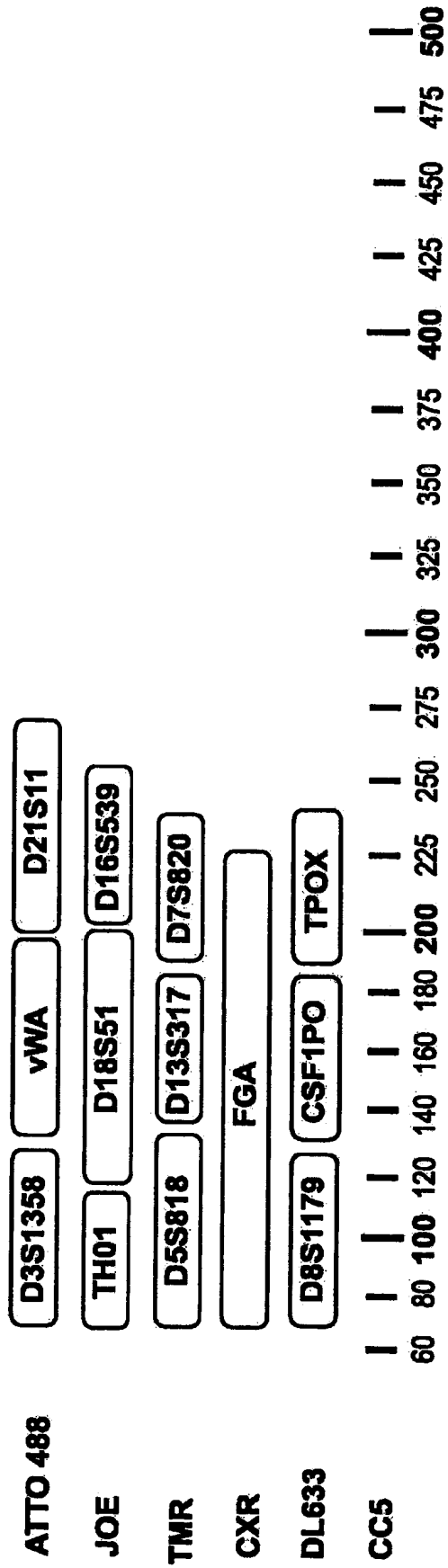
實例 13 圖 13B



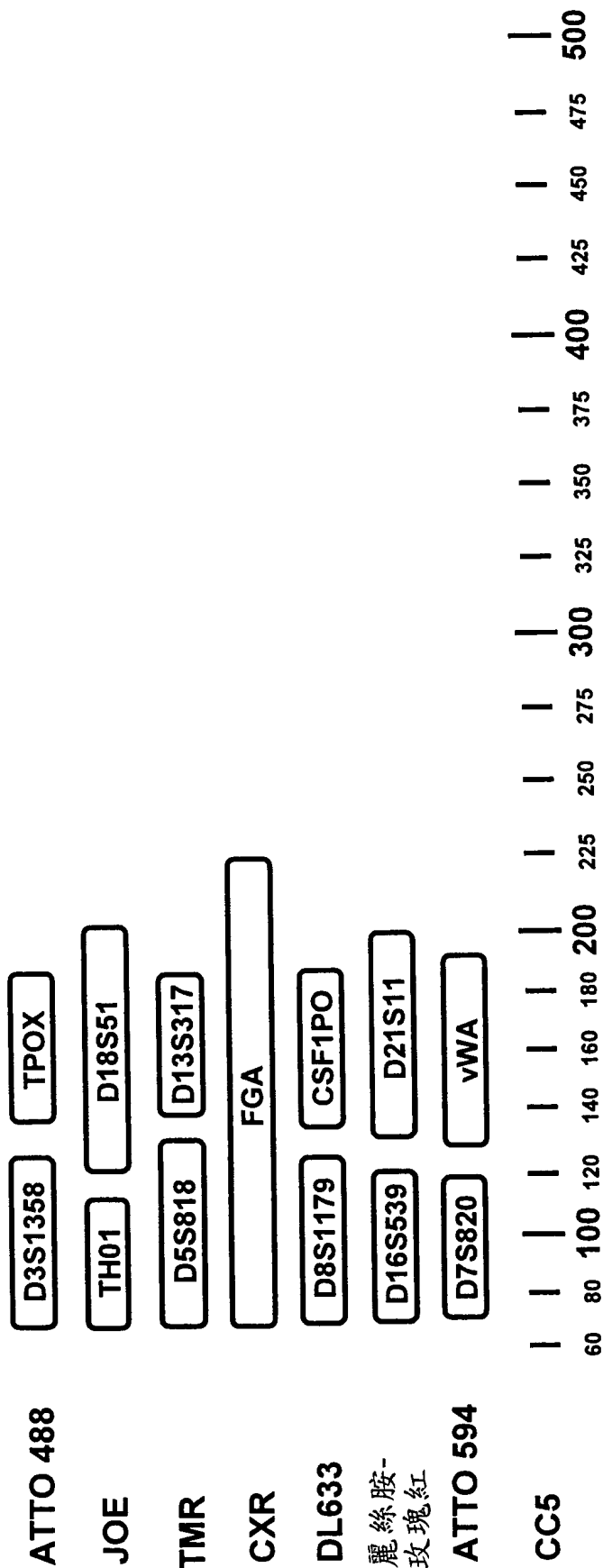
實例 14 圖 14A



實例 14 圖 14B

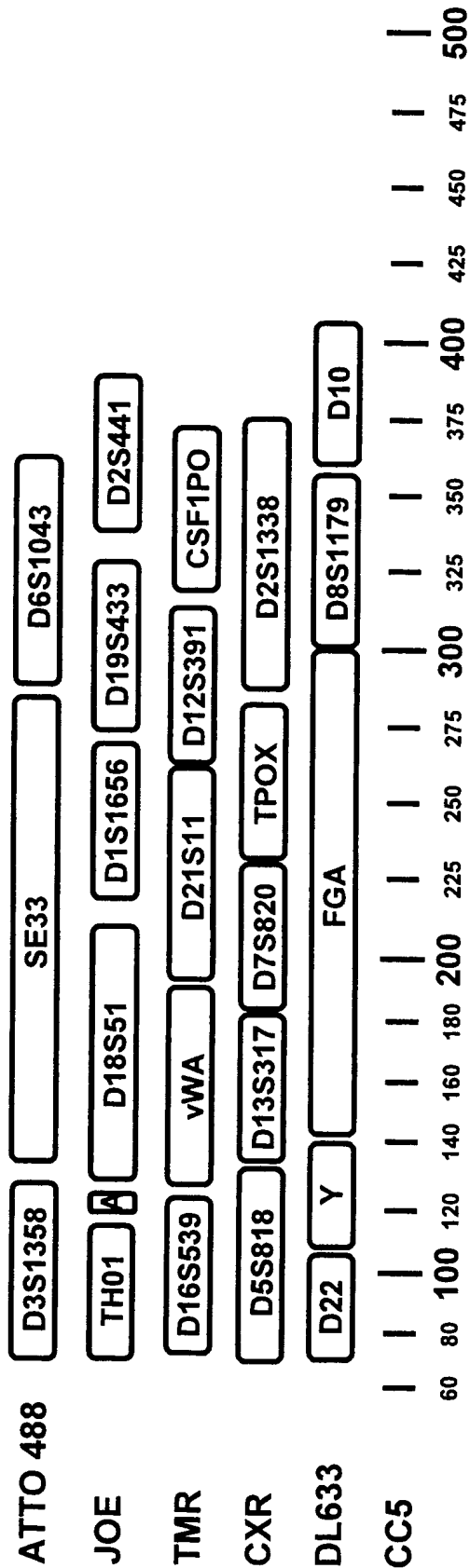


實例 14  
圖 14C



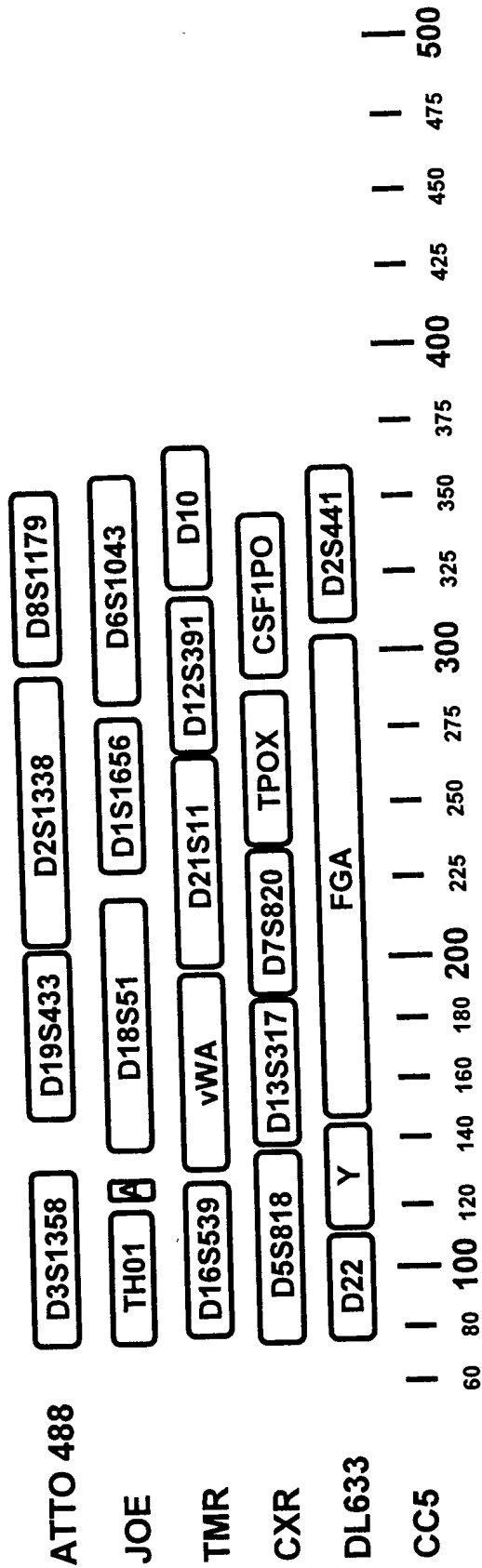
多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
13 基因座 - 5 染料	689	235	2.93
13 Loci - 6 Dyes	689	205	3.36
13 Loci - 8 Dyes	689	160	4.31

實例 15  
圖 15



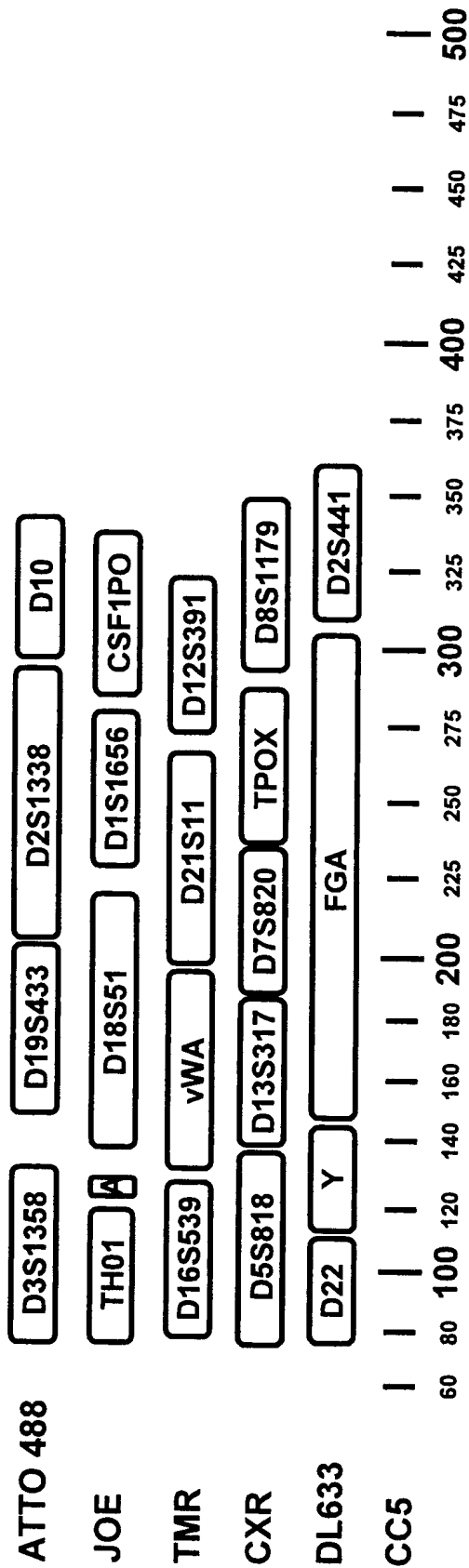
多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
24基因座 - 6染料	1286	340 鹼基	3.78

實例 16  
圖 16



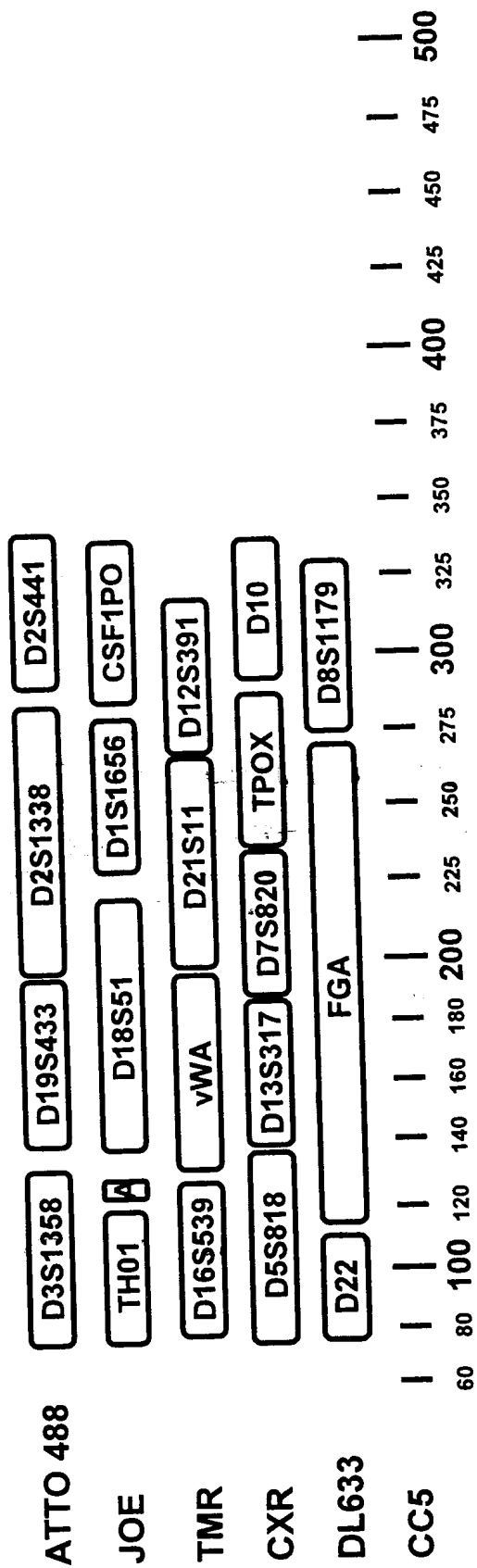
多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
24基因座-6 染料	1136	300	3.79

實例 17  
圖 17



多重內容		STR 基因座 大小範圍總和		多重大小範圍		多重密度	
<b>24</b> 基因座 - <b>6</b> 染料		<b>1072</b>		<b>292</b>		<b>3.67</b>	

實例 18  
圖 18



多重內容	STR 基因座 大小範圍總和	多重大小範圍	多重密度
24 基因座 - 6 染料	1044	278	3.76

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第( 1 )圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)