

Super KASP PCR MixPlus (Low ROX+)

货号/规格: P4051/1 ml, P4052/60 ml

产品简介

Super KASP PCR MixPlus (Low ROX+) 是针对 KASP 技术开发的 2X PCR Mix (含 UDG/dUTP 防污染系统), 并附有 FAM、HEX 标记探针, 只需加 SNP 对应的引物及 DNA 模板即可反应。Super KASP PCR MixPlus 的反应体系经特殊优化, 减少错配引物扩增产物的形成, 显著提高 PCR 扩增的特异性。本品已预混低浓度 ROX 参比染料, 适用于 ABI Q3 等荧光定量仪使用。

KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR, 竞争性等位基因特异性 PCR) 是一种用于基因分型的技术, 基于等位基因特异性 PCR。它使用一种独特的竞争性 PCR 机制, 能够检测特定定位点的单核苷酸多态性 (SNP) 和插入/缺失 (InDels), 具有通量高、成本低和可操作性强等优点, 在农作物性状遗传和改良研究等领域具有广泛的应用。

产品组成

Component	P4051	P4052
2X Super KASP PCR MixPlus (Low ROX+) *	1 ml	60 ml

* 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTPs/dUTP、ROX Reference Dye、Heat-labile UDG、FAM、HEX 标记的探针及其淬灭探针。

保存条件

-20°C 保存, 避免反复冻融。

应用举例

1. 准备工作

1.1 样本 DNA-对于要运行的每个基因分型检测, 包括最少 22 个 DNA 样本以进行群集分析。

1.2 对于每个基因分型检测都应包含无模板对照 (NTCs, 96 孔板上 2 个 NTCs, 384 孔板上 4 个 NTCs)。

1.3 解冻并涡旋所需数量的 Super KASP PCR MixPlus (Low ROX+) 和 Primers Mix (自备), Primers Mix 的配制可参考下表:

试剂	体积	终浓度
Forward primer 1-FAM (100 μM)	10 μl	20 μM
Forward primer 2-HEX (100 μM)	10 μl	20 μM
Reverse primer (100 μM)	25 μl	50 μM
超纯水	5 μl	-
总体积	50 μl	-

2. 配制反应体系

2.1 为将要进行的每个试验准备足够量的 KASP 基因分型混合液, 包括 10% 的过量以允许移液操作。参考下表, 请于冰上配置反应体系:

试剂	体积 (一个反应体系)	
	96 孔板	384 孔板
template DNA [1]	5 μl	2.5 μl
Super KASP PCR MixPlus (Low ROX+)	5 μl	2.5 μl
Primers Mix	0.14 μl	0.07 μl
超纯水	n/a	n/a
总体积	10 μl	5 μl

[1] 建议 KASP 基因分型反应中最终 DNA 浓度的最低值为 2.5ng/μl (基于人类基因组大小)。

2.2 将所需体积的制备好的 KASP 基因分型混合物分装到 DNA 板中的每个孔中。

2.3 用适合 PCR 的、光学透明的密封胶将制备好的反应板密封。

2.4 瞬时离心将液体收集至各孔底部。

3. 设定反应程序进行 KASP 反应

将反应板放置在热循环器或 qPCR 仪器中。参考下表, 运行 KASP 反应:

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
<i>Hot-start Taq activation</i>	95°C	60 sec	1
<i>Touchdown</i>	95°C	15 sec	10
	61°C → 55°C, -0.6°C/循环	15 sec	
	72°C	20 sec	
<i>Amplification</i>	95°C	15 sec	26
	55°C	15 sec	
	72°C	20 sec	
(可选) <i>Read</i> (仅适用于 <i>qPCR</i> 仪)	30°C (低于 40°C 均可)	60 sec	1

注意事项

- 1、存储条件：该产品应存放在-20°C低温冷冻保存。建议分装保存及使用，避免多次冻融。
- 2、对于每个基因分型检测都应包含无模板对照（*NTCs*，96孔板上2个*NTCs*，384孔板上4个*NTCs*）。

本品仅供科学研究使用。

4. 分析结果

4.1 在进行板读取之前，确保板已冷却至低于 40°C。如果板未在低于 40°C 下读取，将无法分析基因分型数据。

4.2 使用具有 *FRET* 功能的板阅读器或 *qPCR* 仪器进行终点板读取。下表列出了 *KASP* 的荧光团。

荧光团	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
<i>FAM</i>	485	520
<i>HEX</i>	535	556
<i>ROX</i>	575	610

4.3 如有需要，对反应板进行进一步的 *PCR* 循环 (*recycle*, 加循环)。 *KASP* 加循环程序见下表：

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
<i>Denaturation</i>	94°C	20 sec	3
<i>Annealing/Elongation</i>	57°C	60 sec	

4.4 将完成的反应板存放在黑暗的冰箱中（最高 4°C，最多 1 周），直到分析数据。这将允许您在需要时执行额外的读取或加循环步骤，以确保您获得了最佳数据。

4.5 使用聚类图分析原始数据，以能够将基因型分配给 *DNA* 样品。