

KP PCR Master MixPlus (Low ROX+)

货号/规格

P4041b/1 ml

P4042b/60 mL

产品简介

KP PCR Master MixPlus (Low ROX+)是针对竞争性等位基因特异性 PCR 开发的一管式混合液,预混了 FAM、HEX 标记探针,只需加 SNP 对应的引物及 DNA 模板即可反应。KP PCR Master MixPlus (Low ROX+)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,能够精准检测特定位置的单核苷酸多态性 (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、动物育种及医学研究等领域具有广泛的应用。

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,同时也支持无需 ROX 校准或关闭 ROX 校准通道的仪器使用。

产品组成

Component	P4041b	P4042b
2X KP PCR Master MixPlus (Low ROX+)	1ml	60 ml

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

保存条件

-20℃保存,避光,避免反复冻融。

应用举例

1. 准备工作

1.1 样本: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 2X KP PCR Master MixPlus (Low ROX+)和 Primers Mix (自备)。

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:

Component	96 孔板	384 孔板
template DNA ^[1]	5 µL	2.5 µL
2X KP PCR Master 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 PCR 反应

将反应板放置在热循环器或 qPCR 仪器中。参考下表,运行反应:

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

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。荧光团信息如下：

荧光团	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
FAM	485	520
HEX	535	556
ROX	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)。加循环程序见下表：

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Denaturation	94°C	20 sec	3
Annealing/Elongation	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。

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。