

KASP PCR MixPlus

货号/规格: P4041/1 ml, P4042/60 ml

产品简介

KASP PCR MixPlus 是针对 KASP 技术开发的 2X PCR Mix, 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。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。

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	P4041	P4042
KASP PCR Mix ^[1]	950 μ l	57 ml
KASP Probe Mix ^[2]	50 μ l	3 ml

[1] 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、缓冲液组分等

[2] 包含 FAM、HEX 标记的探针及其淬灭探针

KASP PCR Mix、KASP Probe Mix 全部组分混合振荡均匀后标记为 2X KASP PCR MixPlus。

保存条件

-20℃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 KASP PCR MixPlus 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 KASP 基因分型混合液 KASP PCR MixPlus, 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 μ L	2.5 μ L
2X KASP PCR MixPlus	5 μ L	2.5 μ L
Primers Mix	0.14 μ L	0.07 μ L
超纯水	n/a	n/a
总体积	10 μ L	5 μ L

[1] 建议 KASP 基因分型反应中最终 DNA 浓度的最低值为 2.5ng/ μ L (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
Hot-start Taq activation	95℃	1 min	1
Touchdown	95℃	15 sec	10
	60℃→54℃, -0.6℃/循环	15 sec	
	72℃	20 sec	
Amplification	95℃	15 sec	26
	54℃	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。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。

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。