

KASP 2x PCR Mix 说明书

I. 试剂盒货号

货号: SNP 分型	产品名称
#GBS-1016-001-1	KASP 2X PCR mix 96/384, 250x10ul reactions (1.25ml)
#GBS-1016-011-1	KASP 2X PCR mix 96/384, 250x10ul reactions (1.25ml), sto ROX
GBS-1016-001	KASP 2X PCR mix 96/384, 500x10ul reactions (2.5ml)
GBS-1016-011	KASP 2X PCR mix 96/384, 500x10ul reactions (2.5ml), sto ROX
GBS-1016-002	KASP 2X PCR mix 96/384, 5,000x10ul reactions (25ml)
GBS-1016-012	KASP 2X PCR mix 96/384, 5,000x10ul reactions (25ml), sto ROX
#GBS-1016-111-1	KASP 2X PCR mix 96/384/1536, 1250x2ul reactions (1.25ml), sto ROX
GBS-1016-112	KASP 2X PCR mix 96/384/1536, 25,000x2ul reactions (25ml), sto ROX
GBS-1016-113	KASP 2X PCR mix 96/384/1536, 250,000x2ul reactions (250ml), sto ROX

II. KASP 基因分型原理

Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP) 这项技术是基于引物末端碱基的特异匹配来对 SNP 分型以及检测 InDels (Insertions and Deletions, 插入和缺失)。

实验流程主要包括:

- 准备: 1) 两条末端碱基不同的等位基因正向引物与一条反向引物构成的 Primer Mix, 两条正向引物 5' 端分别连有不同序列的检测引物序列; 2) 带有不同荧光的两条检测引物 PCR Mix; 3) DNA 模板
- PCR 反应 I: 变性模板与 Primer Mix 中相匹配的引物结合并退火, 延伸后序列被加上了检测引物的序列;
- PCR 反应 II: 等位基因特异性的末端序列的互补链合成;
- PCR 反应 III: 信号产生——特异序列对应的检测引物随 PCR 反应进行指数性增长, 相应信号被检测。

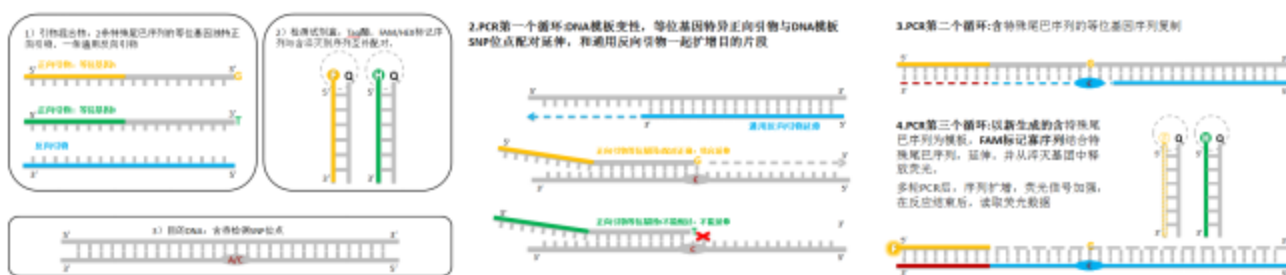


图 1 KASP 检测原理

III. 注意事项

1. 为提高分型成功率, 上游分型引物终浓度应 $\leq 300\text{nM}$; 推荐浓度为 $100\sim 200\text{nM}$;
2. 试剂盒 -20°C 避光保存, 避免长期放置于 4°C 或室温条件下。
3. 轻柔颠倒离心管数次以使试剂混合均匀, 避免产生泡沫, 短暂离心后备用。
4. 尽量使用无菌的蒸馏水。

IV. 实验步骤

1. 解冻并轻柔混匀试剂盒中的 PCR Mix, 短暂离心使管中试剂集中于底部, 冰上保存。
2. 按照下表内容, 在冰上准备 PCR 反应液。

添加组分	加量 (2 μ l 体系)	加量 (10 μ l 体系)
DNA Template	5 ng - 50 ng	25 ng - 250 ng
FLU-Arms 2x PCR Mix	1 μ l	5 μ l
上游分型引物 F1 (10 μ M)	0.02 μ L	0.1 μ L
上游分型引物 F2 (10 μ M)	0.02 μ L	0.1 μ L
下游通用引物 R (10 μ M)	0.06 μ L	0.3 μ L
	补水至 2 μ L	补水至 10 μ L

3. PCR 反应条件

step 1	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	1 循环
step 2	降落 PCR	95 $^{\circ}$ C	15s	10 循环
		61 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, -0.6 $^{\circ}$ C/循环	60 s	
step 3	扩增	95 $^{\circ}$ C	15 s	28~35 循环
		55 $^{\circ}$ C	60 s	
step 4	读板	30 $^{\circ}$ C	30 s (read)	1 循环

备注:

表格中的循环数仅供初步参考, 实际 DNA 模板浓度 和 引物效率 会影响实际需要的循环数, 具体确定方法可参考以下:

- 如 28 个循环后, 发现分型非常明显, 且 NTC (用于溶解模板的溶液) 信号过高, 与其他分型掺杂, 下次扩增循环数调整为 23~25;
- 如 28 个循环后, 发现所有信号区分不开, 则将 PCR 产物用 step 3 的程序加扩增 5~7 个循环后, 再扫描荧光;
- 某些引物如加扩增超过 40 个循环, 分型不集中, 建议使用第二套程序, 57 度延伸 42 循环的方法, 如下:

step 1	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	1 循环
step 2	降落 PCR	95 $^{\circ}$ C	15s	10 循环
		65 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C, -1 $^{\circ}$ C/循环	60 s	
step 3	扩增	95 $^{\circ}$ C	15 s	42 循环
		57 $^{\circ}$ C	60 s	
step 4	读板	30 $^{\circ}$ C	30 s (read)	1 循环

V. FAQ

建议的 PCR 反应体系是怎样的?

96 和 384/1536 孔板, 10 μ L 体系, 其中 4.5 μ L DNA (DNA 浓度 5~50ng/ μ l), 5 μ L mix, 0.5 μ L 引物, 总体积 10 μ L.

384/1536 孔板, 5 μ L 体系, 其中 2.25 μ L DNA (DNA 浓度 5~50ng/ μ l), 2.5 μ L mix, 0.25 μ L 引物, 总体积 5 μ L.

KASP 实验注意事项

- 引物设计: 下游通用引物 3 端避开 A, 长度控制在 60-120 之间; 另外, 在引物合成前, 记得确认 **下游引物是否已经采用反向互补序列**
- 封石蜡油**: 终点法检测, 对体系均一性要求较高, 需要用石蜡油封体系 (先加石蜡油, 后加试剂和模板, 封好石蜡油封 96 孔板, 用或不用贴膜都可以), 10 μ L 体系以下推荐加 10 μ L 石蜡油, 11-20 μ L 体系推荐加 20 μ L 石蜡油;
- 模板浓度: 模板浓度不能过高, 10 μ L 体系, 一般理想加量控制在 25-100ng 之间, 加量过大可能会导致分型点较散;
- 循环数: 首次使用新引物, 应对该引物最合适循环数进行摸索, 从 28 循环起, 每 4 循环收集一次结果, 找出最优结果循环数, 以后可以直接调用该循环数;
- 加样操作: 常温下加样, 加样前应尽量事先准备好实验过程需要用到或需要做的事情 (比如事先加好石蜡油、事先计算并分装好引物、事先解冻或者稀释好模板等), 尽量缩短试剂在常温下操作的时间;