

FLU-ARMS for KASP 2x PCR Mix V5F 说明书

I. 试剂盒货号

货号: 产品名称

BGH1001RV5F	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F 96/384 (2.5ml), sto ROX
BGH1025RV5F	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F 96/384 (25ml), sto ROX
BGH1025RV5F.1	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F.1 96/384 (1.25mlX20), sto ROX
BGH1125RV5F.1	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F.1 96/384 (1.25mlX100), sto ROX
BGH1001HV5F	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F 96/384 (2.5ml), High ROX
BGH1025HV5F	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F 96/384 (25ml), High ROX
BGH1025HV5F.1	FLU-ARMS for KASP 2X PCR mix V5F.1 96/384 (1.25mlX20), High ROX

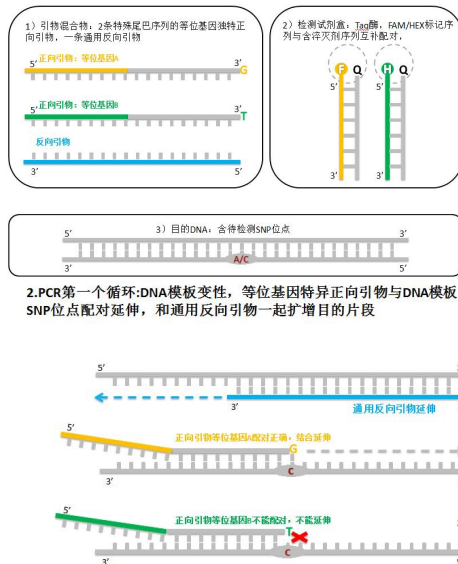
II. FLU-ARMS 基因分型原理

和 KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR) 这项技术类似, FLU-ARMS 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)。

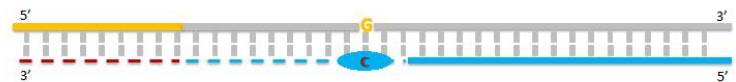
实验流程主要包括:

- 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。

FLU-ARMS for KASP 2x PCR Mix V5F 热启动时间 5 分钟, 拥有超快的反应效率, 一次反应在 40~50 分钟内完成, 适合于快速筛选位点, 最短时间完成大批量实验, 并保证稳定性和高准确率。



3.PCR第二个循环:含特殊尾巴序列的等位基因序列复制



4.PCR第三个循环:以新生成的含特殊尾巴序列为模板, FAM标记探针结合特殊尾巴序列, 延伸。并从淬灭基团中释放荧光。

多轮PCR后, 序列扩增, 荧光信号加强, 在反应结束后, 读取荧光数据



图1 FLU-ARMS 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

- 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。
- 按照下表内容，在冰上准备 PCR 反应液。

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

- PCR 反应条件

step 1	预变性	95℃	5 min	1 循环
step 2	扩增	95℃	5 s	38~45 循环
		58℃	20 s	
step 3	读板	30℃	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 38 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 33；
- 如 38 个循环后，发现所有信号区分不开，则将 PCR 产物用 step 2 的程序继续扩增 5~ 7 个循环后，再扫描荧光。

V. FAQ

建议的 PCR 反应体系是怎样的？

96 和 384/1536 孔板，10μL 体系，其中 2μl DNA（DNA 浓度 25~50ng/ul）， 5μL mix, 0.5 μL 引物，补水至 10ul。

384/1536 孔板，5μL 体系，其中 1μl DNA（DNA 浓度 25~50ng/ul）， 2.5 μL mix, 0.25μL 引物，补水至 5ul。

FLU-ARMS 技术对 DNA 的要求？

建议最小的 DNA 浓度不低于 5 ng / μL。

不同基因组大小所需的 DNA 的量为：待测样品基因组/3000Mb*5ng。

建议设置 DNA 浓度梯度实验，来确定最合适的 DNA 浓度。

粗提的 DNA 即可满足实验需求，请尽量保证 DNA 浓度的一致性，

提取 DNA 尽量不要用到 EDTA。如有 EDTA，建议将 DNA 稀释一下，做一下浓度梯度实验或加 MgCl₂ 优化。

多个引物可以同时跑在同一块板子上吗？

可以，但 FLU-ARMS 技术要求每个引物至少跑 18 个样品加两个 NTC，否则可能影响分群判读，造成较大的误差

FLU-ARMS 试剂的储存条件及建议是什么？

FLU-ARMS 引物可在 4 度保存最长至 1 个月，更长时间的存放建议储存在-20 度以下； FLU-ARMS 2x PCR Mix 用完后尽量马上放置-20 度以下避光保存，冻融尽量不要超过 5 次！