

KASP PCR Mix II

货号: P4021b, P4022b

产品简介

KASP PCR Mix II 是针对 KASP 技术开发的 2X PCR Mix 溶液, 含有双抗体修饰的热启动型 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、高离子浓度缓冲液等 PCR 扩增必需组分 (模板、引物和探针除外) 等。使用时仅需在扩增体系中加入 DNA 模板、特异性引物和探针即可进行 PCR, 大大简化操作过程, 缩短操作时间, 降低污染 (加样次数减少)。KASP PCR Mix II 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等领域具有广泛的应用。

产品组成

Component	P4021b	P4022b
2X KASP PCR Mix II*	1 mL	1 mL × 5
超纯水	1 mL	1 mL × 5

* 包含热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、缓冲液组分等。

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 KASP PCR Mix II 和 KASP Assay 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 Assay Mix + KASP PCR Mix II), 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:

Ordinal	Component	96 孔板	384 孔板
1	template DNA ^[1]	5 µL	2.5 µL
2	2X KASP PCR Mix II	5 µL	2.5 µL
3	KASP Assay Mix	0.14 µL	0.07 µL
4	超纯水 ^[2]	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] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

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°C	1 min	1
Touchdown	95°C	15 sec	10
	56°C → 50°C, -0.6°C/循环	15 sec	
	72°C	20 sec	
Amplification	95°C	15 sec	26
	50°C	15 sec	
	72°C	20 sec	
(可选) Read (仅适用于 qPCR 仪)	30°C (低于 40°C 均可)	60 sec	1

注意: 本产品需要更低的退火温度, 并采用三步法扩增, 否则扩增效率很差。

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。