

版本号: E01/2021

AQP基因分型系统操作使用说明

产品内容

产品组成	AQP-002S 10 μLx1000 rxn	AQP-002M 10 μLx2000 rxn	AQP-002L 10 μLx5000 rxn
HiGeno 2x Probe Mix B	5 mL	10 mL	25 mL

注意事项

使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。

HiGeno 2x Probe Mix B中含有荧光标记探针和ROX染料, 保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。

避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20°C。如果在短期内需要频繁使用, 可在2-8°C环境下保存。

HiGeno 2x Probe Mix B长期请保存在-20°C冰箱或-80°C冰箱。

SNP Primer Mix需根据SNP位点或其他类型的变异位点进行单独设计和合成。

产品简介

AQP基因分型系统又称等位基因特异的定量PCR基因分型系统 (Allele-Specific Quantitative PCR based genotyping assay, AQP), 是一种PCR扩增技术与定量PCR技术结合形成的基因分型系统。该系统采用终点法读取荧光值, 能够对SNP、插入或缺失变异位点进行检测, 具有很大的灵活性, 检测成本较低。

产品特点

1. 本产品为全新开发的基因分型系统, 采用的HiGeno DNA Polymerase具有高灵敏度和特异性强的特点。
2. HiGeno 2x Probe Mix B中包含有HiGeno DNA Polymerase、PCR buffer、dNTPs、双色荧光探针和Mg²⁺, 操作简单方便。
3. 兼容性强, 与已有同类试剂兼容性达到99%以上。

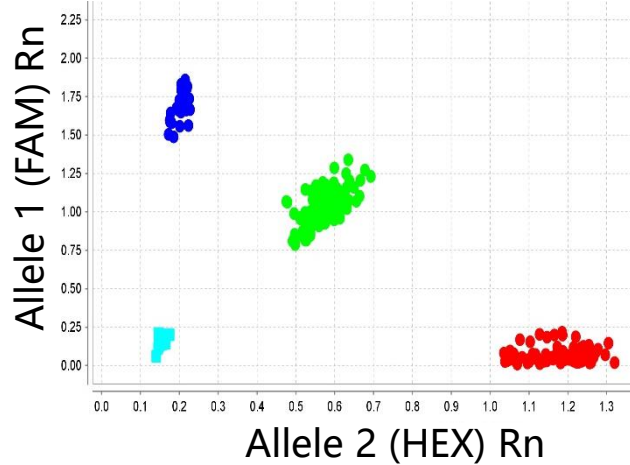


图1. AQP基因分型系统数据分析示例。标记为红色的基因型样品对于HEX标记的等位基因是纯合的, 标记为蓝色的基因型样品对于FAM标记的等位基因是纯合的, 标记为绿色的样品为杂合。

如果没有获得清晰的基因型分簇, 建议继续进行PCR扩增。扩增程序为95°C变性20 s, 57°C退火和延伸40 s, 共计3-6个循环。增加循环扩增结束, 重复步骤4和5, 直到获取较好的基因分型效果。

使用方法

1. DNA样品在PCR板上排列

将要检测的DNA样品按照一定顺序加入任何合适的PCR板上。推荐每孔DNA用量为4-50 ng (建议根据物种基因组大小进行调整, 采用5 µL检测体系, 建议人基因组DNA用量为4ng, 玉米为10ng)。为保证分析结果的准确性, 在单次实验中每个SNP位点至少检测15个样品和1个无DNA模板对照(No Template Controls, NTCs), 同时DNA样品应至少包含两种不同的基因型。

DNA质量对基因分型效果影响较大, 建议在进行基因分型实验前对DNA质量进行检测, OD260/OD280比值应介于1.7~2.0之间。

2. PCR反应体系配置

PCR反应体系中包含4个部分, 分别为HiGeno 2x Probe Mix B、SNP Primer Mix、DNA样品和无菌水。

AQP基因分型系统可使用96孔板的10 µL检测体系、384孔板的5 µL检测体系、浅孔384孔板的1.6 µL检测体系或者1536孔板的1.0 µL检测体系。HiGeno 2x Probe Mix B可用于96孔板的10 µL检测体系或者384孔板的5 µL检测体系, 也可用于浅孔384孔板的1.6 µL或1536孔板的1.0 µL检测体系。

计算每一个SNP引物需要的反应数目(需包含必需的对照), 进一步根据表1计算反应需要的总体积。由于在实验操作过程中存在移液误差, 配置的总体积需要高于实际需求。

将HiGeno 2x Probe Mix B和Primer Mix轻微斡旋混匀, 离心后吸出需求的量加到一个新的离心管中, 同时加入等比例量的无菌水。盖上管盖, 轻微斡旋混匀, 离心, 然后将PCR反应液分装到PCR板上。

加盖封板膜, 离心。

表1. AQP基因分型系统PCR扩增体系构成。

名称	5 µL反应体系	10 µL反应体系
HiGeno 2x Probe Mix B	2.5 µL	5.0 µL
SNP Primer Mix (71.4x)	0.07 µL	0.14 µL
DNA样品	4-10 ng	8-20 ng
无菌水	补水至5 µL	补水至10 µL

3. PCR扩增程序设定和扩增

本产品SNP位点检测使用一组包括两个温度步骤的热循环条件, 而不是传统的三个步骤。在该方案中DNA在较高的温度下变性, 然后在一个较低的相同温度退火和延伸。通常使用的PCR扩增程序如表2所示, 该PCR程序能够提高PCR扩增的特异性和准确性。在特殊情况下, 也可使用如下程序进行扩增: 95°C预变性10 min, 然后95°C变性20 s, 57°C退火和延伸40 s, 共计40个循环。

PCR热循环扩增可在任何合适的PCR基因扩增仪上进行。

注意! 本产品预变性反应必须在95°C 10分钟下完成!

表2. AQP基因分型系统PCR扩增热循环条件。

步骤	过程	温度	时间	循环数
1	预变性*	95°C	10 minutes	1 cycle
2	变性	95°C	20 seconds	10 cycles
	退火/延伸	61°C-55°C (drop 0.6°C per cycle)	40 seconds	
3	变性	95°C	20 seconds	30-34 cycles
	退火/延伸	55°C	40 seconds	
4	扩增结束	25°C	Forever	1

*采用烘干DNA做模板, 预变性时间请使用15分钟, 以便DNA充分溶解。

4. 荧光值读取

PCR扩增循环结束后, 在35°C的环境下, 利用荧光定量PCR仪或者其他仪器读取荧光值。AQP基因分型系统使用荧光团FAM和HEX来区分两个等基因位点。ROX用于校正孔与孔之间由于反应体积误差导致的信号差异。

5. 数据分析和基因型数据获取

我们利用第三方独立软件对步骤4的结果数据进行分析。在该软件中, HEX和FAM数据分别绘制在x轴和y轴上。每个反应孔的HEX和FAM荧光值除以该孔参比染料(ROX)的值, 将数据荧光值进行标准化处理, 获取每一个PCR反应孔的HEX和FAM对应的相对荧光值。根据相对荧光值, 对样品进行聚类分簇, 进一步根据样品簇确定基因型, 具体如图1所示。