

版本号: E01/2020

AQP基因分型系统操作使用说明

产品内容

产品组成	AQP-003S 10 μLx1000 rxn	AQP-003M 10 μLx2000 rxn	AQP-003L 10 μLx5000 rxn
HiGeno 2x Probe Mix C	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 C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 C长期请保存在-20°或-80°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 C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。

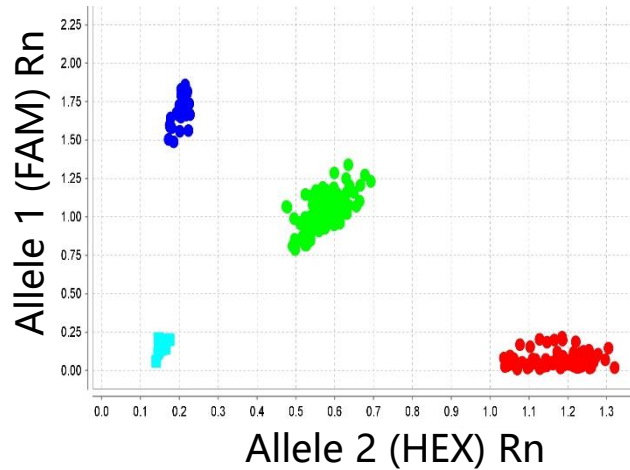


图1. AQP基因分型系统数据分析示例。标记为红色的基因型样品对于HEX标记的等位基因是纯合的, 标记为蓝色的基因型样品对于FAM标记的等位基因是纯合的, 标记为绿色的样品为杂合。

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4-20 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5ng, 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 C、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 C 专为小体积检测反应体系设计, 适用于浅孔384孔板的1.6-2.0 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 C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	1.0 µL反应体系	1.6 µL反应体系
HiGeno 2x Probe Mix C	0.5 µL	0.8 µL
SNP Primer Mix (71.4x)	0.014 µL	0.0224 µL
DNA样品	4-10 ng	8-20 ng
无菌水	补水至1.0 µL	补水至1.6 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。