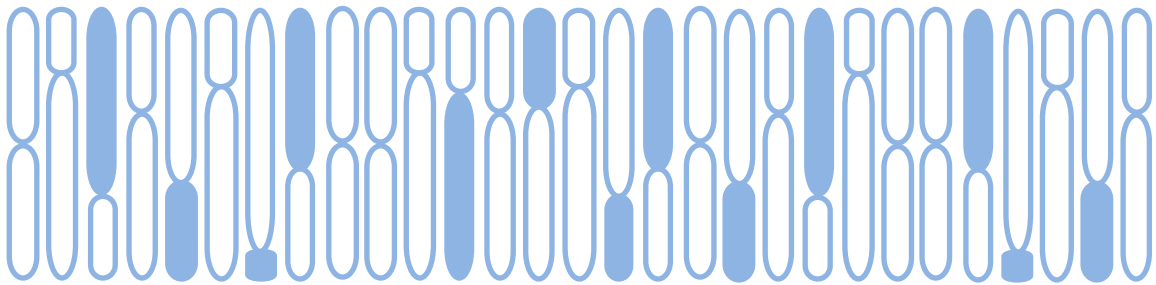




北京嘉程生物科技有限公司

版本号: V1.0/2021

# AQP<sup>TM</sup>基因分型系统使用说明



## AQP™ 基因分型系统目录

- 一、产品简介
- 二、AQP™ 基因分型试剂组成
- 三、注意事项
- 四、AQP™ 基因分型系统检测原理
- 五、DNA 模板
- 六、基因分型实验步骤
  - 6.1 AQP™ 基因分型系统的引物配置
  - 6.2 阴性和阳性对照设置
  - 6.3 DNA 样品在 PCR 板上排列
  - 6.4 PCR 反应体系各组分配比
  - 6.5 AQP™分型试剂的配置和封膜
  - 6.6 PCR 程序设定和扩增
  - 6.7 荧光值读取
  - 6.8 数据分析
- 七、产品详细信息
- 八、常见问题

## 一、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, 检测成本低, 特别适用于大批量筛选项目, 例如植物育种研究和药物基因组研究。

AQP™ 基因分型系统对应的分型试剂由两部分构成:

1. SNP 位点特异的扩增引物 (SNP-Specific Primers): 由两个等位基因特异的正向引物 (Allele-specific forward primers) 和一个通用反向引物 (Common reverse primer) 组成。

2. HiGeno 2x Probe Mix 预混液: 包含 PCR 扩增和产生荧光信号所需的荧光探针。

当上述两个组分与模板 DNA 混合后, 即可进行 AQP™ 基因分型反应。

## 二、AQP™ 基因分型试剂组成

AQP™ 基因分型系统的分型试剂 HiGeno 2x Probe Mix (以 2x 浓度提供), 包含 Taq DNA 聚合酶、通用荧光报告探针、dNTP、缓冲液、MgCl<sub>2</sub> 和参比染料 ROX (5-carboxy-Xrhodamine, succinimidyl ester)。

本试剂盒没有提供的其他必需实验材料和仪器如下:

- 能够读取 FAM、HEX 和 ROX 荧光

基团的荧光酶标仪或荧光定量 PCR 仪

- 吸头、PCR 板和光学透性封板膜

- 进行检测的 DNA 样品

■ Tris-HCl 缓冲液中 (10 mM; pH 8.3) 和 PCR 级实验用水

## 三、注意事项

使用 AQP™ 基因分型试剂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 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 或 -80°C 冰箱。如果在短期内需要频繁使用, 可在 2-8°C 保存。

SNP-Specific Primers 需根据 SNP 位点、插入或缺失变异位点进行单独设计和合成。

**ROX 的兼容性。** AQP™ 基因分型试剂 HiGeno 2x Probe Mix 以低、标准或高 3 种 ROX 浓度提供。使用试剂前, 请确保 ROX 浓度与您使用的荧光定量 PCR 仪之间具有兼容性。如果您需要进一步的帮助, 请与仪器制造商或北京嘉程生物科技有限公司技术支持人员联系。如果使用荧光酶标仪, 建议使用标准 ROX 浓度版本。

## 四、AQP™ 基因分型系统检测原理

AQP™ 基因分型试剂使用一种通用的荧光报告系统, 该荧光报告系统能够生成仪器可识别的与基因型相匹配的荧光信号。

AQP™基因分型系统包含有两个竞争性的等位基因特异的正向引物和一个通用反向引物（图 1A）。两个正向引物 3'末端存在单碱基的差异，5'端分别带有不同的接头序列（图 1A 红色和蓝色部分）。HiGeno 2x Probe Mix 中包含有两个不同的荧光探针，两个探针的 5'端分别标记有 FAM 和 HEX 荧光基团，中间特定碱基带有特异的淬灭基团，3'端序列则分别与正向引物 5'端接头序列互补；通过发夹结构，探针的荧光基团与淬灭基团相互靠近，在 PCR 无扩增情况下，淬灭基团吸收荧光基团的发射光，检测不到荧光信号（图 1B）；HiGeno DNA Polymerase 是一种高保真的热启动 DNA 聚合酶(图 1C)，在碱基存在错配的情况下不能对 DNA 模板进行有效扩增。

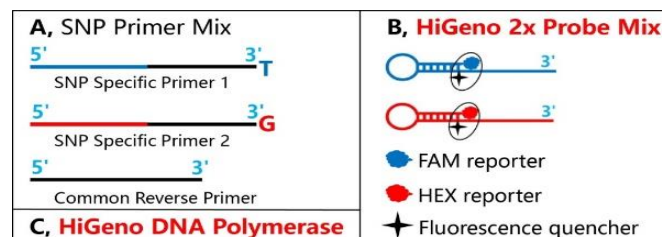


图 1. AQP™基因分型系统组分。

当 PCR 扩增反应启动时，等位基因特异引物结合在目标 SNP 的上游，其 3'端碱基位于 SNP 位点。如果 SNP 位点是杂合的，则两个引物将结合到相应 DNA 模板上，而如果 SNP 位点是纯合的，则仅一个特异引物或另一个特异引物将结合到 DNA 模板上。同时，通用的反向引物将结合到互补链的 SNP 位点下游（图 2II）。随着 PCR 扩增反应的进行，等位基因特异的正向引物接头序列会整合到 SNP 的上游，形成具有接头序列的 PCR 产物（图 2III）。在后续 PCR 扩增中，探针识别接头序列，作为引物进行扩增，形成具有荧光信号的 PCR 产物（图 2V）。如果 SNP 位点的基因型是纯合的，则仅会生成一种可能的荧光信号，而如果 SNP 位点是杂合的，则结果将是混合的荧光信号（图 2VI）。

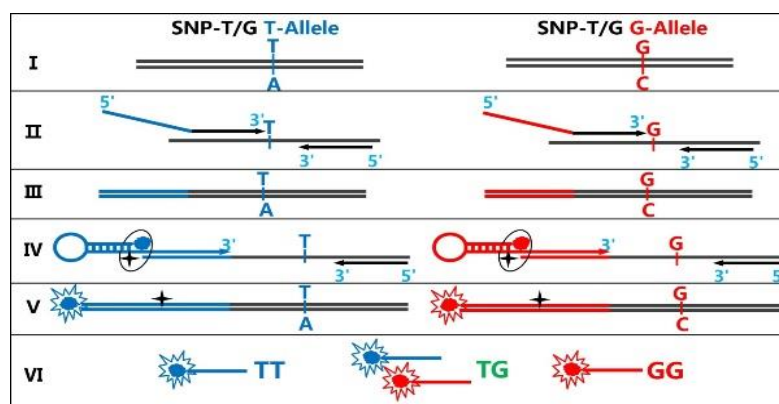


图 2. AQP™基因分型系统原理。I , DNA 模板；II , SNP 特异引物扩增；III, SNP 特异引物扩增产物；IV, 探针扩增；V, 荧光标记产物；VI, 荧光值读取和 SNP 分型分析。

## 五、DNA 模板

通常，每个 PCR 反应中加入 4-50 ng 高质量的 DNA 即可满足 AQP™ 分型需求。PCR 反应中 DNA 的加入量与基因组的大小直接相关，如果对较大的基因组进行基因分型，则每个反应将需要更大量的 DNA。相反，对于较小的基因组，每个反应则需要较少的 DNA 量。

为了获得最佳实验结果，应使用纯度较高和浓度相对一致的 DNA 样品。高通量检测使用 HiGeno 2x Probe Mix 预混液时，可使用粗提法提取样品 DNA，但是在开始大规模检测工作之前应对 DNA 样品进行抽样检测和预实验测试。通过抽取几个样品进行浓度测试后，可以对所有样品进行相同倍数的稀释，以达到样品浓度的相对一致。对于直接使用样品裂解液作为模板，在使用 HiGeno 2x Probe Mix 预混液前，必须进行样品稀释和预实验测试，因为裂解产物所含的 PCR 反应抑制物质浓度太高，可能使预混液无法耐受，进而无法获得有效的结果。在极少数情况下，样品稀释后的 DNA 浓度可能太低而无法进行 PCR 扩增，在这种情况下，应对样品进行纯化处理。

**EDTA 能够严重抑制 PCR 反应，因此 DNA 样品中应尽量避免 EDTA 存在。**建议将 DNA 样品溶解在 Tris-HCl 缓冲液中 (10 mM; pH 8.3) 或 PCR 级的水中。

## 六、基因分型实验步骤

### 6.1 AQP™ 基因分型系统的引物配置

先将 3 个引物分别稀释到 100  $\mu$ M，然后按照表 1 进行引物配置。如果已有 KASP 的 SNP 位点检测引物，可直接与 HiGeno 2x Probe Mix 预混液结合使用。

表 1. AQP™ 基因分型系统引物配置方法。

SNP-Specific Primers	终浓度 ( $\mu$ M)	加入体积 ( $\mu$ L)
Allele-specific primer 1-FAM (100 $\mu$ M)	12	12
Allele-specific primer 2-HEX (100 $\mu$ M)	12	12
Common, reverse primer (100 $\mu$ M)	30	30
PCR grade water	-	46
Total	-	100

### 6.2 阴性和阳性对照设置

为了保证基因分型数据的准确性，除测试样品外，还应在 PCR 板上使用对照样品。建议在每个基因分型板上包括两个 NTCs (no-template controls, NTCs)。NTC 孔的荧光信号强度与模板 DNA 孔的信号强度差异可以提高对基因分型数据有效性的判定。通常，NTC 样品的信号值应接近原点。NTC 孔中观察到的任何扩增都表明存在污染或非特异性扩增。

在分型实验中，也可以使用阳性对照样品。阳性对照样品应该是已知基因型的 DNA 样品。在实验中，阳性对照样品应聚集在其基因型的预期区域中。

### 6.3 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 使

用量为 4-50 ng。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。

根据要排列的 DNA 样品数量选择合适的液体处理系统。此外，需要确定使用干燥 DNA (dried DNA)还是湿 DNA (wet DNA)进行分型实验。两种形式的 DNA 都行之有效，但有不同的优点和缺点。如果要处理少量 DNA 样品，建议手动进行排列。

在干燥 DNA 时，将 DNA 分配到干净的 PCR 板后，应在 55°C 的实验室烘箱中放置 1 小时，或者直到样品明显干燥为止。干燥后的 DNA 在室温下可存放至少 3 个月或更长时间。在配置 PCR 反应体系时，必须以正确的比例添加水以补充干燥失去的水体积。

#### 6.4 PCR 反应体系各组分分配比

AQP™基因分型预混液可用于任何 PCR 反应板或反应体积；根据 PCR 反应体系大小，无需使用其他产品。

AQP™基因分型 PCR 反应体系包含 4 个部分，分别为 HiGeno 2x Probe Mix、SNP-Specific Primers、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 检测体系和浅孔 384 孔板的 1.6 μL 检测体系。如果使用湿 DNA 样品，反应体系配置请参考表 2 进行 PCR 体系配置；如果使用干 DNA 样品，请

参考表 3 进行 PCR 反应体系配置。

表 2. 湿 DNA 方法 PCR 反应体系各组分构成。

名称	湿 DNA (wet DNA)方法 (μL/孔)		
	96 孔板	384 孔板	浅孔 384 孔板
HiGeno 2x Probe Mix	5	2.5	0.8
SNP-Specific Primers	0.14	0.07	0.022
DNA 样品	x	x	x
无菌水	5-x	2.5-x	0.8-x
<b>合计</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>1.6</b>

注：SNP-Specific Primers 不计入 PCR 反应体积。

计算每一个 SNP 位点需要的反应数目（需包含必需的对照），进一步根据表 2 或 3 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量。

表 3. 干 DNA 方法 PCR 反应体系各组分构成。

名称	干 DNA (dried DNA)方法 (μL/孔)			
	96 孔板	384 孔板	1536 孔板	浅孔 384 孔板
HiGeno 2x Probe Mix	5	2.5	0.5	0.4
SNP-Specific Primers	0.14	0.07	0.014	0.011
DNA 样品	N/A	N/A	N/A	N/A
无菌水	5	2.5	0.5	0.4
<b>合计</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0.8</b>

表 2 和表 3 中显示的总反应体积为近似值；AQP™基因分型系统的 PCR 反应体系中 SNP-Specific Primers 体积被忽略，因为它不会产生有功能意义的稀释，进而也不会影响 HiGeno 2x Probe Mix 预混液的性能。

## 6.5 AQP™分型试剂的配置和封膜

根据 PCR 板的类型和样品数量，可以使用合适的自动或手动移液器进行分液。

分配完所有反应液后，必须用光学透明膜密封 PCR 板并离心，以确保所有组分均位于孔的底部。

## 6.6 PCR 程序设定和扩增

AQP™基因分型系统的 PCR 扩增程序使用一组包括两个温度步骤的热循环条件。在该方案中 DNA 在较高的温度下变性，然后在在一个较低的温度退火和延伸。通常使用的 PCR 扩增程序如表 4 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。

**注意！本产品预变性反应必须在 95°C 10 分钟下完成！**预变性时间过短，则 DNA 聚合酶活性无法有效激活，可导致后续 PCR 扩增效率下降，甚至扩增失败。

PCR 热循环扩增可在任何合适的 PCR 基因扩增仪上进行。

如果在初始 PCR 扩增结束后未获得足够明确的基因型分簇，则应使用表 5 中的扩增循环条件继续进行 3 个循环扩增，并再次读取和分析荧光信号值。如果分簇结果仍不够理想，可以继续增加 PCR 循环，直至观察到紧密且分离良好的基因型分簇为止。

表 4. 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 min	1 cycle
2	变性	95°C	20 secs	10 cycles
	退火/延伸	61°C-55°C (drop 0.6°C per cycle)	40 secs	
3	变性	95° C	20 secs	28-34 cycles
	退火/延伸	55° C	40 secs	

\*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。

表 5. AQP™ 基因分型系统进一步 PCR 扩增热循环条件。

过程	温度	时间	循环数
变性	95° C	20 secs	3
退火/延伸	55° C	40 secs	

## 6.7 荧光值读取

PCR 扩增循环结束后，在终点荧光模式下，利用荧光定量 PCR 仪或读板机读取荧光信号值。

由于 AQP™ 的化学反应原理，需要在 ≤40°C 的环境下读取样品的荧光信号值。使用荧光定量 PCR 仪时，PCR 反应完成后应在 ≤40°C 的条件下读取荧光信号值，而不要使用实时数据生成的终点曲线。

AQP™ 基因分型系统使用荧光基团 FAM 和 HEX 来区分两个等基因。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。3 个荧光基团的激发和发射波长如表 6 所示。

表 6. AQP™分型系统使用的荧光基团

荧光基团	激发光 (nm)	发射光 (nm)
FAM	485	520
HEX	535	556
ROX	575	610

### 6.8 数据分析

数据分析可以使用群集分析软件完成，也可以在 Excel 中完成。

我们利用第三方独立软件对 AQP™ 基因分型数据进行分析。在该软件中，HEX 和 FAM 荧光信号值分别绘制在 x 轴和 y 轴上。根据荧光信号值，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 3 所示。

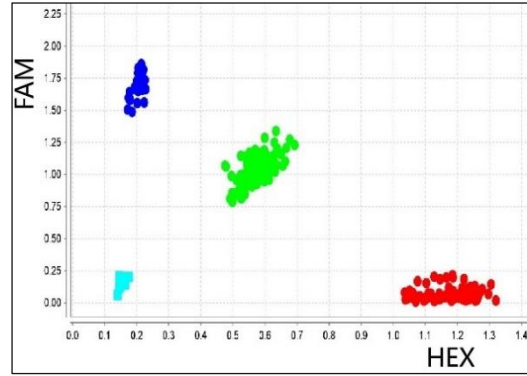


图 3. AQP™ 基因分型系统数据分析示例。标记为红色的基因型样品对于 HEX 标记的等位基因是纯合的，标记为蓝色的基因型样品对于 FAM 标记的等位基因是纯合的，标记为绿色的样品为杂合。

## 七、产品详细信息

货号	名称	ROX level	包装	反应数目
AQP-001S	HiGeno 2x Probe Mix A	Low ROX	5mL	10μL 反应体系，1000 个反应
AQP-001M	HiGeno 2x Probe Mix A	Low ROX	10mL	10μL 反应体系，2000 个反应
AQP-001L	HiGeno 2x Probe Mix A	Low ROX	25mL	10μL 反应体系，5000 个反应
AQP-002S	HiGeno 2x Probe Mix B	Standard ROX	5mL	10μL 反应体系，1000 个反应
AQP-002M	HiGeno 2x Probe Mix B	Standard ROX	10mL	10μL 反应体系，2000 个反应
AQP-002L	HiGeno 2x Probe Mix B	Standard ROX	25mL	10μL 反应体系，5000 个反应
AQP-003S	HiGeno 2x Probe Mix C	High ROX	5mL	10μL 反应体系，1000 个反应
AQP-003M	HiGeno 2x Probe Mix C	High ROX	10mL	10μL 反应体系，2000 个反应
AQP-003L	HiGeno 2x Probe Mix C	High ROX	25mL	10μL 反应体系，5000 个反应



## 八、常见问题

**问：**目前我正在使用 KASP 基因分型试剂，是否可以直接替换为 AQP™ 的分型试剂？

**答：**可以直接替换！您可以在与 KASP 相同的 PCR 循环条件下使用 AQP™ 基因分型试剂。

另外，AQP™ 分型试剂中使用的 HiGeno DNA Polymerase 活性比 KASP 分型试剂相应酶的活性高，每个 PCR 循环的退火和延伸时间可设定为 30-40 秒。

**问：**如何订购 AQP™ 分型试剂？

**答：**可以直接拨打产品和技术咨询电话进行订购，也可以扫描页面底端的二维码进行订购。



北京嘉程生物科技有限公司

北京市门头沟区石龙经济开发区永安路 20 号 3 号楼 A-7511 室

产品和技术咨询电话：13581582894

邮箱：[jiachengbio@126.com](mailto:jiachengbio@126.com)

网址：[www.jasongen.com](http://www.jasongen.com)

