

## 2\*Kasp PCR master mix

### KM112 2ml

#### KASP 等位基因特异扩增介绍

PCR 技术发明后的 1988 年，等位基因特异扩增（ASP）/扩增受阻突变体技术出现。该技术原理简单，即利用 3'引物，最后 1~4 个尤其是最后 1 个碱基的差异，区分并特异扩增特定等位基因 DNA 片段。

KASP 技术从根本上解决了 DNA 聚合酶及 PCR 体系对 SNP 识别的问题，能严格进行特异扩增，产生正确的等位基因扩增信号。

荧光共振能量转移（Fluorescence resonance energy transfer，FRET）荧光基团和对应荧光淬灭基团距离较近时，荧光基团发出的荧光，会被淬灭基团吸收，发射出更长波长的荧光，或者放出热量。此时在此荧光对应的波长内检测不到该基团荧光信号。一旦二者分离，则荧光信号可被检测到。

KASP 采用了 FRET 原理来检测 FAM 以及 HEX 荧光引物的扩增信号，对应的等位基因发生扩增时，将出现对应的荧光信号。

#### 2\*Kasp PCR master mix 体系的配置

成分	加入量	终浓度
2*Kasp PCR master mix	5ul	1*
引物 3(10um)	0.15ul	150nm
引物 4(10um)	0.15ul	150nm
引物 5(10um)	0.4ul	400nm
DNA 模板	10-100ng	10-100ng
超纯水	补水至 10ul	

注意：2\*Kasp PCR master mix 长期保存-20℃，4℃保存 2 周，勿反复冻融。

### PCR 热循环程序

步骤	温度	时长
1	94°C	15min
2	94°C	20s
3	65°C	60s
4	同步 10 个循环	
5	94°C	20S
6	57°C	60S
	同步 28-33 个循环	

注意：大部分引物在循环数 38-40 的时候，分型效果最佳。一部分扩增好的引物在 35 个循环的时候，已经可以完美分型。少数引物在 40 个循环的时候，仍然处于指数增长期，需要继续扩增 3-5 个循环达到最佳的效果。增加循环的 PCR 程序为 94°C 20S, 57°C 60S 3-5 个循环。

### 2\*Kasp PCR master mix 采用的荧光基团

荧光	功能	激发波长	发射波长
FAM	报告 Allele 1	492nm	518nm
HEX	报告 Allele 2	533nm	559nm
ROX	荧光内参	578nm	604nm

### 2\*Kasp PCR master mix 引物设计与合成

2\*Kasp PCR master mix 采用 5 条引物进行 PCR 反应，其中 2 条荧光通用引物包含在 2\*Kasp PCR master mix 中，其余 3 条为标记特异引物，需要根据实验目的定制设计合成。

这 3 条引物，一条为标记位点的特异引物，另 2 条为 SNP 等位基因特异引物。这 2 条引物的 5' 分别加上 21 个碱基特定通用接头序列，用于与荧光分别加上 21 个碱基的特定通用接头序列，用于与荧光通用引物匹配扩增，与 FAM 荧光匹配的接头序列为 GAAGGTGACCAAGTTCATGCT, 与 HEX 荧光匹配的接头序列

为 GAAGGTCGGAGTCAACGGATT。标记引物设计基本原则可采用通用的引物设计规则，引物长度 18~30 bp，扩增片段小于 250 bp（含引物），在满足引物设计条件前提下，越短越好。注意等位基因特异引物加上接头后的二级结构变化以及二聚体的稳定性。

### DNA 质量和浓度

2\*Kasp PCR master mix 对 DNA 质量要求不高，普通 CTAB、SDS、TPS 甚至碱煮法均可正常工作。每个反应加入 10~100ng 为最佳，浓度过低或者浓度严重不均一可能导致分型失败。一般情况下，取模板 DNA 2~5 ul 进行 1%琼脂糖凝胶电泳，大部分样本可观测到明显 DNA 条带即合格，可直接或者再稀释 2~5 倍后取 1ul 加入到 PCR 体系中。若电泳显示 DNA 主带明显，但实验结果较差，则可能源于 DNA 溶液中含有较多的 PCR 抑制剂，请用合格的超纯水稀释 5~10 或梯度稀释摸索最佳浓度。请勿用 TE 溶液溶解 DNA，其中的 EDTA 可能会改变 PCR 所需的  $Mg^{2+}$  浓度进而影响分型效果。

### 2\*Kasp PCR master mix 不能分型是怎么回事？

- (1) DNA 浓度过低，保证每个反应体系内有 10ng 以上模板 DNA，大基因组物种如小麦，请保证 100ng 以上。
- (2) DNA 含有大量 PCR 抑制剂，请将模板进行梯度稀释再次尝试，或者重新纯化 DNA。
- (3) DNA 浓度严重不均一，分型较差的样本 DNA 含量过低。请重新准备 DNA 样本。
- (4) PCR 循环太少。
- (5) 实际上分型已经成功，但群体中只有一种等位基因型，因缺乏其它等位基因的对照，导致分型误判。
- (6) 引物自身扩增差。请更换扩增好的引物进行实验。(7) 引物失效，请重新合成引物。
- (7) 若只有杂合和一种亲本等位基因型，缺少另一种亲本等位基因型。A)请检查群体是否为回交世代；B) 异源多倍体的位点多拷贝现象，请设计单一拷贝特异引物；C) 该等位突变纯合致死，无纯合现象，或纯合现象罕见。
- (8) 若出现单个严重离群点，请检查：A) 该 PCR 孔内是否有颜色污染；B) 该 PCR 孔是否漏加/破损泄露/蒸发。请删除该数据点，并重新实验。