

A4501 基因型信息	
	FAM=TT; FAM/ Cy5=TG; Cy5= GG
物 种	
基 因	
其 它	
PCR 扩增大小	bp

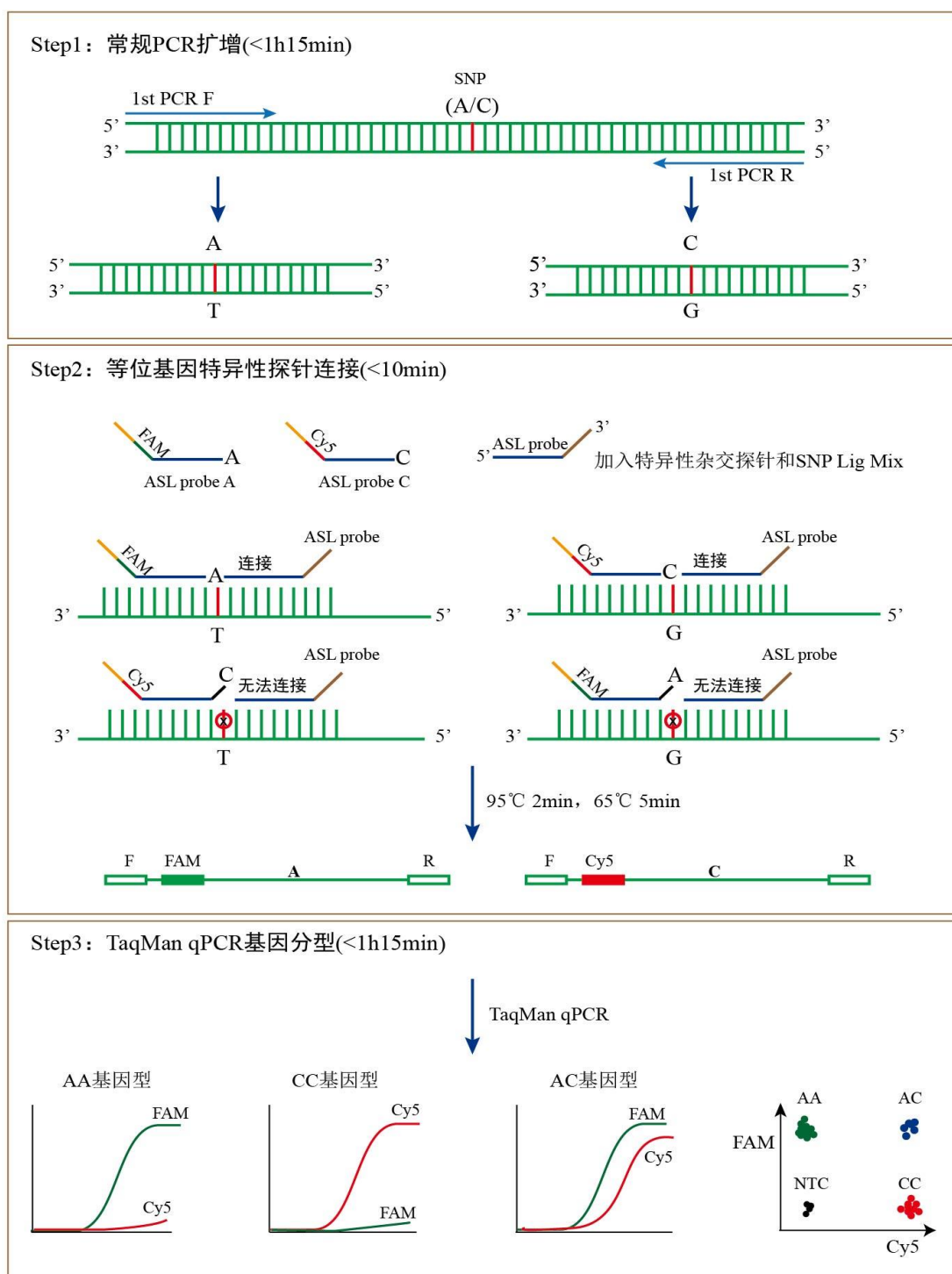
组 分

	名 称	500T
A0601	2XSuper Taq PCR Mix(with Dye)	5 ml
A4500	10× SNP Lig Mix	1 ml
A2301	5×Hi TaqMan qPCR Mix	2 ml
A4500	5×SNP TaqMan Assay (FAM/Cy5)	2 ml
订制	1 st PCR Primer F(10 μM)	0.5 ml
订制	1 st PCR Primer R(10 μM)	0.5 ml
订制	80× SNP ASL Probe	150 μl

注意:

- (1) A4501 使用 FAM/Cy5 双探针，对于拥有 Cy5 通道检测能力的定量 PCR 仪，优先推荐该探针组合。
- (2) A4502 使用 FAM/HEX 双探针，对于没有 Cy5 通道检测能力的定量 PCR 仪，则选择使用该探针组合。
- (3) -20℃可保存 3 年。

描述: ASL (Allele Specific Ligation) TaqMan PCR Genotyping Kit 是 HaiGene 自主研发的创新型基因分型技术, 使用该技术方案可快速高效的进行 SNP、插入缺失等基因分型试验, 通常在 3 个小时内可完成整个工作。该方案的最大优点为 SNP 分型准确、重复性高; 且不需要高纯度基因组 DNA、成本低、操作简单易懂, 仅需要普通 PCR 仪和定量 PCR 仪 (具备 FAM/Cy5 or Hex 双通道) 即可完成实验。该试剂盒适用于用于各种动植物、微生物、病毒样本的基因分型和亚型鉴定。试剂盒中的创新的 ASL Probe 修饰探针和高特异性 SNP Ligase, 高效保证产物的特异性, 提供绝佳的基因分型鉴定, 原理如下图所示。该试剂盒为定制型产品, 请提供相应的 SNP 号或突变位点序列信息, 我处完成试剂盒定制的周期为 3 个工作日。



操作步骤**1. 常规 PCR 扩增，体系配置**

2XSuper Taq PCR Mix(with Dye)	10 μ l
1st PCR Primer F (10 μ M)	0.8 μ l
1st PCR Primer R (10 μ M)	0.8 μ l
模板 DNA	5~20ng
ddH ₂ O	Up to 20 μ l

2. 常规 PCR 扩增程序 (PCR 仪)

循环数	温度	时间
1 st Cycle	95°C	2min
25-35 Cycles	95°C	20s
	58°C	20s
	72°C	30s
Last Cycle	72°C	2min

电泳检测目的条带，可允许有<20%比例的非特异条带。

3. 等位基因探针，杂交连接，体系配制

	1 个样品	10 个样品
ddH ₂ O	16.75 μ l	167.5 μ l
80×SNP ASL Probe	0.25 μ l	2.5 μ l
10×SNP Lig Mix	2 μ l	20 μ l
上述 PCR 扩增产物	1 μ l	单独添加

4. 等位基因探针，杂交连接程序 (PCR 仪)

	温度	时间
变性	95°C	2min
杂交连接	65°C	5min
	30°C	1min
探针连接产物，储存于-20°C		

5. TaqMan 定量 PCR 扩增分型，体系配置

5×Hi TaqMan qPCR Mix	4 μ l
5×SNP TaqMan Assay (FAM/Cy5)	4 μ l
步骤 4 获得的连接产物	2 μ l
ddH ₂ O	10 μ l

6. RealTime TaqMan PCR 扩增分型 (定量 PCR 仪)

(1) 根据所用定量 PCR 仪使用方法，设置程序为基因分型模式。

(2) 在样本对话框中，对样品进行荧光标记染料

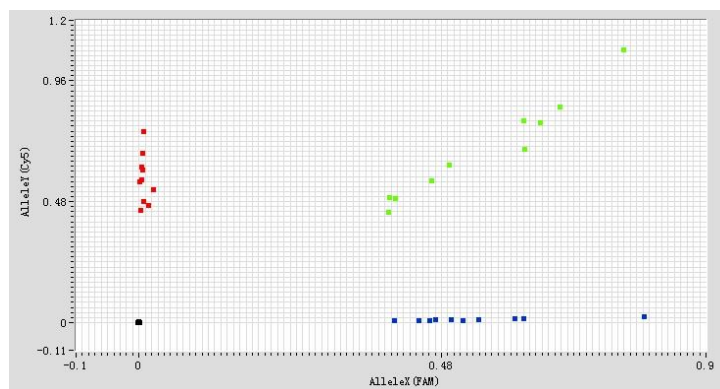
FAM/Cy5 (与步骤 5 使用对应) 染料组合。

(3) 定量 PCR 扩增程序

循环数	温度	时间
1 st Cycle	95°C	15min
28 Cycles	95°C	10s
	60°C	30s (收集信号)

(4) 基因分型结果分析

在基因分型窗口下进行结果查看，必要时可查看扩增曲线。

**注意事项**

(1). 常规 PCR 扩增产物，通常要求目的条带明亮，可允许有少量非特异性产物，通常比例不高于 20%。如果产物不能很好的获得扩增，a.请检查模板 DNA 质量是否达标，b.TM 值可在 50~60°C 进行优化。通常我处设计的引物都可以获得理想的扩增结果，对有困难的序列区域，如高 GC、高重复，我处也可以安排重新设计合成。研究者也可以自行设计合成。产物大小要求 200~2000bp，突变位点远离引物区 50bp 以上。

(2). NTC 对照样品可在步骤 3 中，不加入 PCR 扩增产物，采用 ddH₂O 进行阴性反应。NTC 在定量 PCR 扩增过程中必须每一次都要加入。

(3). 对于拥有 Cy5 通道检测能力的定量 PCR 仪，我们推荐用 FAM/Cy5 探针组合。FAM/HEX 探针组合在绝大多数的定量 PCR 以上也能获得准确的基因分型结果，如果不能很好的基因分型，可能存在荧光串色问题，请联系设备供应商进行荧光矫正。