



通用型直扩实时竞争性等位基因特异性扩增检测试剂盒

Universal Direct Real-Time Competitive Allele-Specific Detection Kit (Hight Rox)

货号	规格	反应次数
BDAG0047-1ml	1ml	200rxn (5ul/rxn)
BDAG0047-5ml	5ml	1000rxn (5ul/rxn)
BDAG0047-10ml	10ml	2000rxn (5ul/rxn)

运输：冰袋运输，储存：-20℃保存可保存 24 个月。

试剂组分：

组分名称	货号		
	BDAG0047-1ml	BDAG0047-5ml	BDAG0047-10ml
Direct Real-Time Competitive Allele-Specific Detection Master Mix (2×)	1 mL	5 mL	10 mL
Buffer RLB03	7.5 mL	37.5 mL	75 mL

备注：本产品中 Direct Real-Time Competitive Allele-Specific Detection Master Mix (2×) 包含**高浓度 ROX**，适用于如下型号 Real Time PCR 仪：

- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific);
- Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific);
- Step One Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等

产品描述：

本产品可针对血卡或血斑、组织、植物叶片等样本，无需进行核酸提取，采用竞争性等位基因特异性扩增原理和方法，进行 SNP 基因分型检测。本产品预混液(Direct Real-Time Competitive Allele-Specific Detection Master Mix, 2×)中已经包含检测所需要的通用探针，客户只需根据检测位点设计两条位点特异性引物及一条下游引物即可开展实验。使用新型通用探针可以进行实时荧光检测。



使用试剂盒中特殊的 Buffer RLB03 组分，对样本进行简单预处理后直接进行竞争性等位基因特异性扩增反应，所得 SNP 分型检测的结果可媲美以核酸提取后的高纯 DNA 产物作为模板的反应效果，具有节省操作时间和降低费用的显著优点。

本产品中使用了经过定向改造和抗体封闭的直扩型热启动聚合酶(Hot-Start DNA Polymerase)，配合条件优化的热启动专用缓冲体系，对血卡样本中的 PCR 抑制物具有极强的耐受性，可有效避免类似于非热启动型聚合酶导致的非特异性扩增反应，从而提升 PCR 扩增效率。同时也能够针对不同 GC 含量的基因完成扩增，获得理想的分型结果。

产品特点

1. 无需核酸提取或者纯化，直接对样本进行竞争性等位基因扩增反应检测 SNP，省时省力；
2. 预混液(Master Mix, 2×)中所含通用探针可以进行实时荧光检测，用户仅需设计普通引物即可，大大降低检测成本；
3. 使用本试剂盒进行竞争性等位基因扩增反应效果可媲美以高纯 DNA 提取产物作为模板的反应效果；
4. 可以进行 Hot Start 法 PCR 反应，具有高扩增效率、高扩增灵敏度的特点；
5. 可针对高 GC 含量片段进行有效扩增，扩增能力强。

扩增体系和条件

1. 样本前处理

- 1) 向 0.2 mL EP 管（或 96 孔 PCR 板）中加入 50 μ L Buffer RLB03；
- 2) 用剪刀（或者打孔器）剪取 1~2 片 2-3 mm 尺寸的干血片、植物叶片或者 2-3mg 的组织样本，加入到 Buffer RLB03 中，瞬离确保干样本完全浸入到液体中；
- 3) 将 EP 管于 95℃ 下加热 5min 后，置于平板离心机 4000g 离心 2min（或台式离心机 12,000RPM 离心 2min），可直接吸取上清液作为 PCR 反应模板使用。

2. 反应体系构建

组分	体积 (μL/ rxn)		终浓度
	Mix A	Mix B	
Direct Real-Time Competitive Allele-Specific Detection Master Mix (2×)	5	10	1×
Allele-Specific Primer 1 (10 μM) ^{*1}	0.15	0.3	0.15 μM
Allele-Specific Primer 2 (10 μM)	0.15	0.3	0.15 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.42	0.84	0.42 μM
Template ^{*2}	Variable	Variable	/
PCR-Grade H ₂ O	To 10	To 20	/
总体积/rxn	10	20	

备注:

^{*1}: 可预先将检测引物按照下表配置方法, 配置成 72× Primer Mix:

组分	体积	终浓度
Allele-Specific Primer 1 (100 μM)	10.8 μL	10.8 μM
Allele-Specific Primer 2 (100 μM)	10.8 μL	10.8 μM
Reverse Primer (100 μM)	30 μL	30 μM
ddH ₂ O	48.4 μL	/
总体积	100 μL	

^{*2}: 建议模板加入量为总反应体积的 10~30%, 优选加入量为 20%, 请勿超过 30%。如需加入更多量模板请与本公司技术人员联系; 样本若需要长期保存请将上清液置于 -20 °C 保存。

3. 反应程序

Step	Temp.	Time	Cycles
Pre-PCR Read / Data Collection	30°C	1 min	1 Cycle
Initial Denaturation	95°C	5 min	1 Cycle
Denaturation	95°C	15 sec	10 Cycles
Annealing / Extension (Touch-down) ^{*1}	65°C	1 min	
Denaturation	95°C	15 sec	30 Cycles
Annealing / Extension / Data Collection	57°C	1 min	
Post-PCR Read / Data Collection ^{*2}	30°C	1 min	1 Cycle

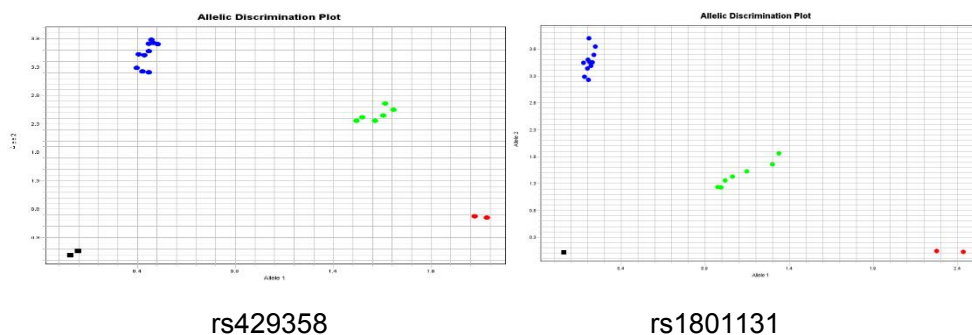
备注:

^{*1}: Touch-down, 65~57 °C, 每个循环下降 0.8 °C;

^{*2}: 通用探针的荧光基团分别为 FAM 和 VIC, 进行荧光收集时需选择该两个通道。若选择终点法收集荧光, 请设置在 30 °C, 1 min 进行。

应用实例

使用本试剂盒，对 22 个血卡样本进行处理后，使用直接竞争性等位基因扩增方法对两个位点（rs429358 和 rs1801131）进行 SNP 基因分型，实验结果显示成功分型，且 cluster 集中于预设区域。



注意事项

1. 预混液(Master Mix, 2×)使用前上下轻柔颠倒数次，确保各试剂成份完全混匀，并短暂离心收集试剂至容器底部，试剂如未充分混匀可能导致反应性能下降；
2. Master Mix 置于 4℃ 的保存时间不应超过 1 周，长期保存置于 -20℃；
3. 配制 PCR 反应 Mix，依次加入各成份后需涡旋混匀并进行短暂离心；
4. Master Mix 对光敏感，应避免长时间和强光照射；
5. 本产品仅供科学研究使用。