# 2X FASA™ Genotyping Master Mix (Standard ROX)

## 产品目录号：RK30136

## 产品组分

| 组分名称 | 组分编号 | 规格-1<br>1 mL | 规格-2<br>5 mL | 规格-3<br>25 mL |
|---|---|---|---|---|
| 2X FASA™ Genotyping Master Mix (Standard ROX) | RM30252 | 1 mL | 5 mL | 5 × 5 mL |

## 产品说明

2X FASA™ Genotyping Master Mix 是利用竞争性等位基因特异性扩增与荧光报告系统相结合(Fluorescent Allele Specific Amplification based Genotyping Systems，FASA）实现基因分型检测的专用试剂盒。FASA 基因分型系统包括 2 种等位基因特异性正向引物（3'末端序列不同，5'末端融合检测探针序列），1 种等位基因通用反向引物和 2 种不同荧光标记的检测探针；通过正向引物 3'末端碱基的特异性匹配实现竞争性等位基因特异性扩增，扩增产物被对应的探针检测到后以不同荧光基团标记加以区分，实现对 SNP 及 InDel（Insertion and Deletion）快速分型检测。本产品使用灵活性高，检测成本低，特别适用于高通量等位基因检测，如分子育种、基因组学研究等领域。

## 保存条件

本产品置于-15℃~-25℃低温下保存，尽量减少冻融次数。

## 产品特点

**简便灵活：**产品成分包含PCR缓冲液、dNTP、$MgCl_2$、DNA聚合酶、参比染料ROX和2种荧光标记检测探针，只需设计等位基因竞争性扩增引物组合，即可实现基因分型，实验操作简便灵活，分型结果准确可靠。

**成本低廉：**使用通用检测探针，无需针对每个检测位点进行探针设计与合成，检测成本大幅降低，尤其适用于高通量等位基因分型检测。

**兼容性好：**经过严格测试验证，可完美替换国内外同类基因分型试剂盒。

## 注意事项

1. 2X FASA™ Genotyping Master Mix 中含有荧光基团标记探针和 ROX 参比染料，保存本产品或配制 PCR 反应液时需避免强光照射。
2. 避免反复冻融，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，如果短期内频繁使用请在 2~8°C 暂存，以减少试剂反复冻融。
3. 本品为 Standard ROX 预混型产品，请确保选择试剂 ROX 浓度与您使用的荧光定量 PCR 仪匹配，如果使用荧光酶标仪读板，选择 3 种 ROX 浓度试剂均可匹配。
4. 使用前，轻轻涡旋混匀试剂，避免产生泡沫，瞬时离心后，置于冰上备用。
5. 使用时，需要根据检测 SNP 或 InDel 序列信息，单独设计与合成等位基因分型引物组合，包括 2 个特异性正向引物和 1 个通用性反向引物，其中 2 个正向引物 5'末端需加上对应的检测探针序列（检测探针序列信息见“常见问题与解决方案”）。

## 操作说明

### 实验前准备

1. 仪器与试剂选择：读板仪器选择可读取 FAM、HEX 和 ROX 荧光的酶标仪或 qPCR 仪。选择 2X FASA™ Genotyping Master Mix 时，请参照 qPCR 仪型号选择与之匹配的 ROX 浓度试剂，酶标仪匹配高/标准/低 3 种 ROX 浓度试剂均可。
2. PCR 引物预混配制：将基因分型引物稀释到 100 μM，按照表 1 进行引物预混；对于已有的 KASP 基因分型检测引物，可直接用于引物预混液配制。

**表 1. FASA 基因分型系统 PCR 引物预混液配制**

| SNP Specific Primers | 终浓度（μM） | 加入体积（μL） |
|---|---|---|
| Allele-specific Primer 1-FAM (100 μM) | 12 | 12 |
| Allele-specific Primer 2-HEX (100 μM) | 12 | 12 |
| Common, Reverse Primer (100 μM) | 30 | 30 |
| Nuclease-Free $H_2O$ | N/A | 46 |
| Total Volume | N/A | 100 |

3. DNA 样本准备与对照设置：本产品适用于各种反应体积下的溶液 DNA 与烘干 DNA 样本检测。对于 DNA 溶液，应尽量避免含有 EDTA



E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

Forresearchpurposesonly.Notfortherapeuticordiagnosticpurposes.
Pleasevisithttp://abclonal.com.cnforacompletelistingofrecommendedproducts.

等抑制 PCR 成分。一般情况下，使用粗提 DNA 样本即可，如存在 PCR 抑制剂，建议用 $H_2O$ 稀释 3~5 倍后使用。为了获得最佳实验结果，应确保各反应中 DNA 样本投入量和质量相对一致，每个反应中投入 2.5~25 ng DNA 即可。为了确保分型结果的准确可靠，建议每次分型 DNA 样本数大于 20 个，以获得不同基因型；同时设置 2 个 NTC，以排除污染对结果的影响。

4. 其他试剂准备：2X FASA™ Genotyping Master Mix、Nuclease-Free $H_2O$、纯净液体石蜡油（密封 PCR 反应，防止体系蒸发）。
5. PCR 耗材准备：荧光定量 PCR 专用管或 96/384 孔板及高透性封板膜。

### 反应体系配制

1. PCR 试剂准备：室温下完全融化 2X FASA™ Genotyping Master Mix（2X FASA™ GMM），SNP Specific Primers，Nuclease-Free $H_2O$，充分涡旋混匀试剂，防止产生气泡，瞬时离心后，置于冰上备用。
2. DNA 模板准备：将 DNA 样本取出在室温下融化，涡旋混匀后瞬时离心，定量后吸取等质量的 DNA 样本加入到各 PCR 管中（烘干 DNA 可忽略此步）。
3. 配制反应预混液：参照表 2 所示，根据检测 DNA 样本数，计算所需 PCR 反应预混液体积；取干净的 2.0 mL 离心管，将 2X FASA™ GMM、SNP Specific Primers、Nuclease-Free $H_2O$ 依次按比例加入，轻轻涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上备用（因存在体积损耗，建议按照所需体积 1.1 倍配制预混液）。

**表 2. FASA 基因分型系统反应体系（以 10 μL 和 5 μL 体系为例）**

| 组分名称 | 96 孔板（溶液 DNA） | 384 孔板（溶液 DNA） | 96 孔板（烘干 DNA） | 384 孔板（烘干 DNA） |
|---|---|---|---|---|
| DNA Template | 5 uL | 2.5 μL | N/A | N/A |
| 2X FASA™ GMM | 5 uL | 2.5 μL | 5 uL | 2.5 μL |
| SNP Specific Primers | 0.14 uL | 0.07 μL | 0.14 uL | 0.07 μL |
| Nuclease-Free $H_2O$ | N/A | N/A | 5 uL | 2.5 μL |
| Total | 10 μL | 5 μL | 10 μL | 5 μL |

4. 分装反应预混液：根据反应体系，计算预混液分装体积（可忽略 SNP Specific Primers 体积），将步骤 3 中配置好的预混液分装到步骤 2 含有 DNA 模板的各 PCR 管中。完成分装后，加入 5~10 μL 液体石蜡油，用封板膜密封 PCR 板，轻轻涡旋混匀后，快速离心收集反应液于管底，置于冰上备用。

### 反应程序设置

1. 按照表 3 在 PCR 仪上设置反应程序，开启顶盖加热，热盖温度设置为 105℃；完成程序设置后，放入 PCR 反应管，启动 PCR 程序。

**表 3. FASA 基因分型系统反应程序**

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---|---|---|---|
| 预变性 | 95℃ | 15 min | 1 |
| 特异性扩增 | 95℃ | 10 s | 10 |
| | 65℃，-1℃/循环 | 60 s | |
| 富集性扩增 | 95℃ | 10 s | 30* |
| | 57℃ | 60 s | |
| 读板 | 30℃ | 30 s | 1 |

2. 表 3 中“富集性扩增”步骤的循环数仅供参考，实际反应最佳循环数会受到 DNA 质量和扩增效率影响；首次使用的引物，应摸索“富集性扩增”步骤的最佳循环数。例如 30 个循环后若发现分型结果不明确，可将 PCR 产物用表 4 程序继续扩增后再次读板，如果分型结果仍不明确，可再次按表 4 程序继续扩增，直至获得明确分型结果（一般不超过 42 个循环）。若 PCR 引物 Tm 值较低（<60℃）或扩增至 38 个循环后荧光信号较低且分型结果仍不明确，可把表 3 中“富集性扩增”步骤的退火和延伸温度由 57℃降低到 55℃，再次摸索最佳 PCR 循环数。

**表 4. FASA 基因分型系统加扩 PCR 反应程序**

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---|---|---|---|
| 变性 | 95℃ | 10 s | 4 |
| 退火和延伸 | 57℃ | 60 s | |



E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126

Forresearchpurposesonly.Notfortherapeuticordiagnosticpurposes.
Pleasevisithttp://abclonal.com.cnforacompletelistingofrecommendedproducts.

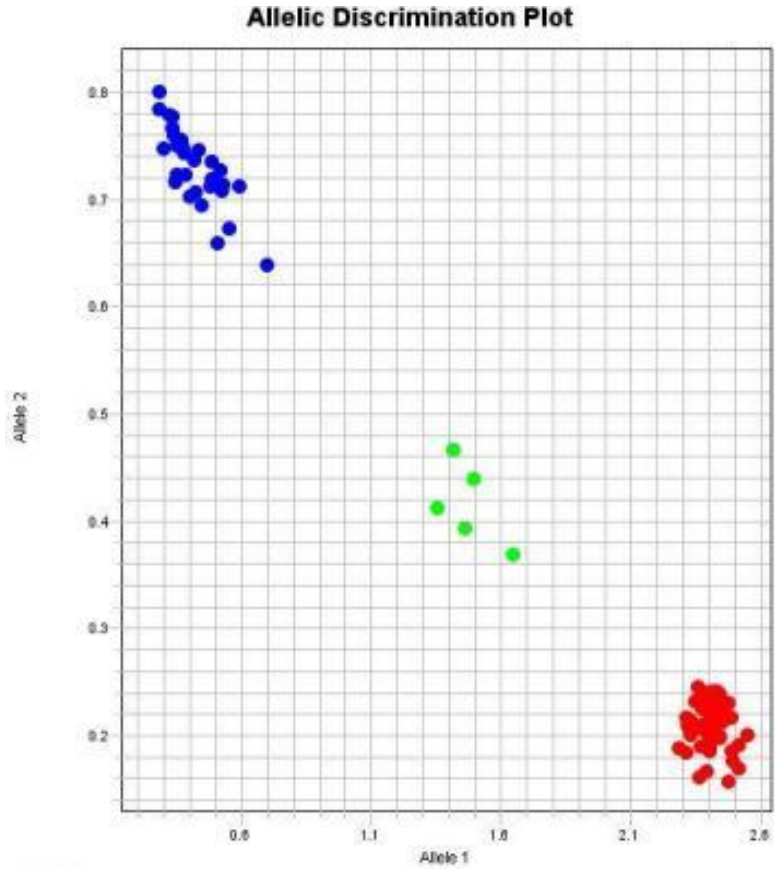
**数据读取与分型**

1. qPCR 仪读板：PCR 扩增结束后，在低于 30℃的温度下读取荧光信号值。使用 qPCR 仪读取荧光信号值时，应在终点荧光模式下读板，其中 FAM 和 HEX 信号设置用以区分 DNA 样本的基因型，ROX 信号设置用于校正孔间误差。
2. 酶标仪读板：使用酶标仪设备读板时，请按照表 5 所示设置 3 种荧光基团的激发波长和发射波长。其中 FAM 和 HEX 信号设置用以区分 DNA 样本的基因型，ROX 信号设置用于校正孔间误差。

**表 5. FASA 基因分型系统数据读取的波长设置**

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

3. 数据分析：对于 qPCR 仪或者酶标仪读板数据，可使用该仪器内置“基因分型软件”进行自动化分析，也可在 Excel 中手动完成数据分析。数据分析方法：以各反应孔的 FAM 和 HEX 荧光信号值（或与该孔 ROX 比值），分别为 x 轴和 y 轴绘制“散点图”，根据散点分布位置，对 DNA 样本进行聚类和基因分型。基因分型结果可参考下图。




FASA 基因分型结果示例：红色点（FAM）为纯合基因型(aa)样本，蓝色点（HEX）为纯合基因型(AA)样本，绿色点（FAM/HEX）为杂合基因型(Aa)样本。


E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
Forresearchpurposesonly.Notfortherapeuticordiagnosticpurposes.
Pleasevisithttp://abclonal.com.cnforacompletelistingofrecommendedproducts.

## 常见问题与解决方案

### 1. 基因分型失败

首先确认 PCR 扩增是否成功，建议在 PCR 扩增完成后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，确认目标产物是否扩增成功及是否存在非特异性扩增产物。目标产物的特异性高效扩增是基因分型准确性的前提，扩增失败或者非特异性扩增都会导致基因分型失败或分型结果不可靠。一般来说，本实验中 PCR 扩增是否成功是由 PCR 引物和 DNA 样本质量决定的，引物设计不合理、引物降解、DNA 样本存在抑制剂、DNA 样本浓度太低或降解是常见问题，应该优先排查和解决，具体方案可参见以下内容。

### 2. 引物设计不合理

推荐使用 Primer 3（https://bioinfo.ut.ee/primer3/）进行基因分型引物设计（参数设置：扩增子大小为 70~150 bp，引物长度为 18~28 nt，引物 Tm 值为 60~62 ℃）；完成引物设计后，正向引物 5' 末端需要加入检测探针序列，检测探针序列信息：5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3'（FAM），5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3'（HEX）；引物合成时，推荐引物纯化方式为 PAGE 或 HPLC，以获得高纯度 PCR 引物，提高 PCR 特异性。

### 3. 引物 Tm 值低或扩增效率低

如果 PCR 引物 Tm 值低（<60℃）或 PCR 扩增效率低（扩增至 38 个循环后荧光信号低，分型位点不集中，分型结果不明确，电泳检测不到目标条带），建议首次使用的引物，应摸索“富集性扩增”步骤的最佳循环数（30/34/38/42）。

### 4. DNA 样本存在 PCR 抑制剂

本产品适用于各种反应体积下的溶液 DNA 与烘干 DNA 样本检测。对于 DNA 溶液，应尽量避免含有 EDTA 等抑制 PCR 成分。一般情况下，使用粗提 DNA 样本即可，如存在 PCR 抑制剂，建议用 $H_2O$ 稀释 3~5 倍后使用。稀释后仍无法扩增的 DNA 样本，建议纯化或重提 DNA。

### 5. DNA 样本浓度太低或太高

使用 Nanodrop 或 Qubit 检测 DNA 样本浓度，推荐使用浓度>2.5 ng/μL 的 DNA 样本；为了获得最佳实验结果，应确保各反应中 DNA 样本投入量相对一致，每个反应中投入 2.5~25 ng DNA 即可。

### 6. DNA 样本数量太少或基因型单一

建议每次基因分型 DNA 样本数量>20 个，反应 DNA 样本数量太少，反应 DNA 样本基因型单一或遗传背景相似，都易导致无法获得 3 种不同基因型（AA,Aa,aa）而使基因分型失败。

### 7. 反应体系蒸发

FASA 基因分型系统对信号均一性要求高，推荐用纯净液体石蜡油密封反应体系，防止体系蒸发影响分型结果。建议在 5 μL 反应体系中加入 5 μL 液体石蜡油密封，10 μL 反应体系中加入 10 μL 液体石蜡油密封。

### 8. 反应存在污染

应避免实验环境及操作带来污染，建立 NTC 排查反应污染。


E-mail：cn.market@abclonal.com
TEL：400-999-6126
Forresearchpurposesonly.Notfortherapeuticordiagnosticpurposes.
Pleasevisithttp://abclonal.com.cnforacompletelistingofrecommendedproducts.