

APPLICATION NOTE

在 SpectraMax 微孔读板机上利用 KASP 基因分型技术检测 SNPs

Young Mee Yoon | Field Applications Scientist | Molecular Devices

前言

基因分型是一种在不同个体间检测他们的 DNA 序列以分析遗传差异的过程。用于基因分型的方法很多，使得研究人员有能力研究人类、微生物和植物中的基因多样性。单核苷酸多态性 (SNPs) 是其中一种最为普遍的遗传变异类型，包括某个特定位点的单核苷酸突变。SNP 基因分型已经被证实在识别许多物种的疾病相关突变中非常有用，因此也已开发出很多针对 SNP 检测的技术¹。

Kompetitive 等位基因特异性 PCR 因其高准确性、高性价比并在分析设计方面的高度灵活性而成为一种最为广泛使用的 SNP 基因分型技术。KASP 使用两条等位基因特异的正向引物和一条通用反向引物，通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目标 DNA 序列，与其序列相对应的反应产物则被标记上荧光染料。如果一个样品是纯合子，PCR 产物将只会被 HEX 或 FAM 荧光染料标记，但如果是杂合体，则会出现被 HEX 和 FAM 同时标记的产物。未参与标记的荧光染料会被淬灭^{2,3}。KASP 可在微孔板中进行操作，并且可使用荧光微孔读板机进行检测。

在本篇应用文献中，我们展示了使用来自 LGC 基因组学的 KASP 检测验证试剂如何在 SpectraMax 微孔读板机上读取最终的 KASP 产物。

第一个实验是为了验证每种荧光染料都可以在读板机中得到特定的信号，染料包括 FAM、HEX 和 FAM/HEX。第二个实验中，使用由供应商提供的已知 DNA 样品进行 KASP 实验，PCR 产物在读板机中检测以验证样品的正确基因型。

材料

- 标准 ROX 验证试剂盒 (LGC Genomics cat. KBS-1014-101)
- 热循环仪 (MJ Research cat. PTC-200)
- TempPlate 半裙 96-孔 PCR 板 (USA Scientific cat. #1402-9700)
- 384-孔低体积全黑微孔板 (Corning cat. #3676)
- Microseal B PCR 板密封薄膜 (Bio-Rad cat. #MSB1001)
- SpectraMax i3x 多功能微孔读板机 (Molecular Devices cat. #i3x)
- SpectraMax M5e 多功能微孔读板机 (Molecular Devices cat. #M5e)

优势

- 在荧光微孔读板机平台上实现 SNP 基因分型
- 针对 SNP 基因型的快速、高性价比和高通量方法
- 利用 SoftMax Pro 软件轻松获取和分析多波长荧光读数

方法

微孔读板机兼容性测试

验证试剂盒包括单独的已稀释荧光染料管：FAM、HEX 和 FAM + HEX。将它们直接加入微孔板中无需任何热循环。每管荧光染料同样包含 ROX，一种无源参考染料用于标准化 HEX 和 FAM 信号，消除加液产生的差异影响。每种荧光染料 (HEX、FAM 和 HEX + FAM) 加 5 μ L 到 384 孔板中，且包含三个重复。孔板以干净薄膜密封，然后以 560 x g 离心一分钟。离心好后，立即将孔板放入 M5e 和 i3x 读板机中使用表1中的仪器设置进行读数。

KASP 基因分型反应物检测

第二个测试中，验证试剂盒包含 36 个已知样品，包括 33 个 DNA 样品和 3 个无模板对照 (NTC)。每个样品以 5 μ L 量加入 96 孔板中进行 PCR。相同体积的基因分型混合物 (2x KASP Master 混合物加 KASP 测定混合物) 添加到每孔中。无源参考染料 ROX 也包含在 KASP Master 混合物中。用干净薄膜密封孔板并以 560 x g 离心一分钟。立即启动热循环反应。详细的热循环条件列举在表2中。反应完成后，每个样品取 5 μ L 转移到 384 孔板中并在微孔读板机中使用表1中的仪器设置进行检测。

结果

第一个测试，FAM、HEX 和两者的混合物这几种荧光染料的相对荧光单位与 ROX 进行标准化且标准化值在 SoftMax[®] Pro 软件中绘制曲线。如图1所示，得到了三个不同的集群。

第二个测试中，ROX 标准化的扩增 DNA 样品荧光在 SoftMax Pro 软件中绘制曲线 (图2)。三个显著的集群被检测出来。

FAM 纯合子位置靠近X轴，而 HEX 纯合子则位置靠近Y轴，包含FAM和HEX的杂合样品所形成的的集群在两个纯合子集群之间。

无模板对照形成的集群如预期靠近最初位置。所得数据与供应商的验证试剂盒基因分型结果高度一致。

仪器	M5e	i3x
Read mode	Fluorescence	
Read type	Endpoint	
Wavelength Lm1 (FAM) Lm2 (HEX) Lm3 (ROX)	485 ex/515 cutoff/520 em 535 ex/550 cutoff/556 em 575 ex/610 cutoff/610 em	485 ex/520 em 535 ex/556 em 575 ex/610 em
PMT and optics	Auto, 6 flashes/read	6 flashes/read

表1 读板机设置用于数据采集

步骤	描述	温度	时间	循环数/步数
1	活化	94°C	15 min	1 cycle
2	变性	94°C	20 sec	10 cycles
	退火/延伸	61-55°C	60 sec (drop 0.6°C per cycle)	
3	变性	94°C	20 sec	30 cycles
	退火/延伸	55°C	60 sec	

表2 热循环设置用于 KASP 基因分型反应

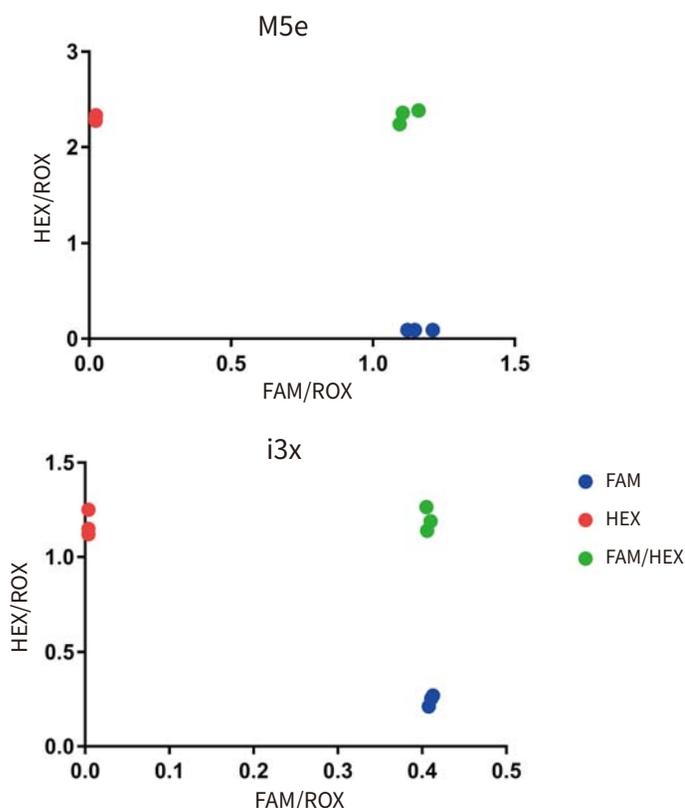


图1 使用三种荧光染料进行读板机验证。HEX/ROX 和 FAM/ROX 读值来自于 M5e 和 i3x 且都形成三种不同的集群

结论

SpectraMax M5e 和 i3x 读板机通过使用 FASP 基因分型实验得到了充分的验证。基于光栅单色器的光学系统可以轻松的建立三种激发/发射波长对儿, 满足 PCR 反应产物中代表三种基因分型的荧光探测要求。两款仪器上的结果也是一致的。通过 SoftMax Pro 软件对基因集群进行数据分析和绘图实现了标准化结果的快速可视化。

参考文献

1. Chen, X., and Sullivan, P.F. "Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput." *The Pharmacogenomics Journal* 3, (2003): 77-96.
2. Patterson, E.L., Fleming, M.B., Kessler, K.C., Nissen, S.J., and Gaines, T.A. "A KASP genotyping method to identify nothern watermilfoil, eurasian watermilfoil, and their interspecific hybrids." *Frontiers in Plant Science* 8, (2017): 752.
3. Smith, S.M., Maughan, P.J. "SNP genotyping using KASPar assays." *Plant Genotyping* 1245, (2015): 243-256.

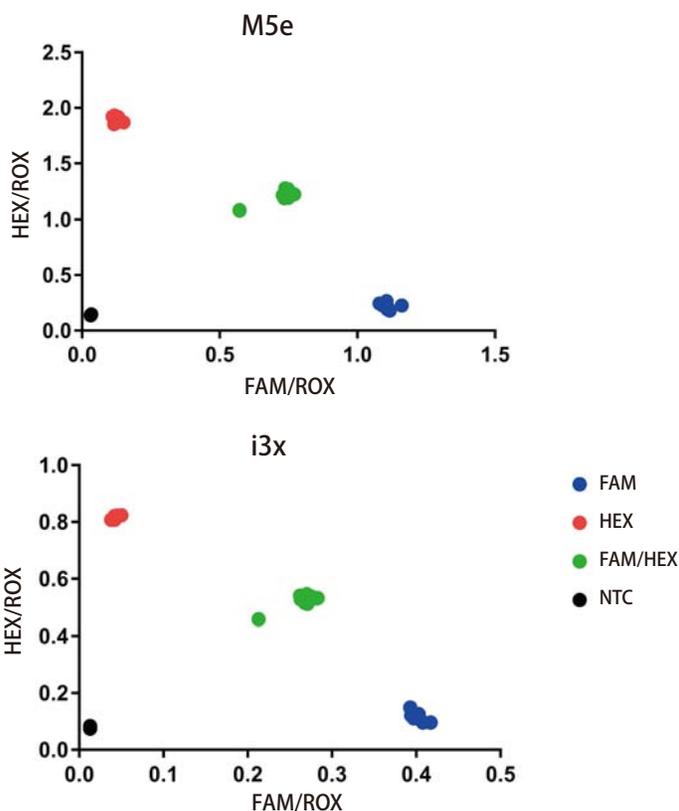


图 2 KASP 基因分型结果。PCR 产物在读板机上得到三个不同集群, 包括 FAM 纯合子 (蓝色), HEX 纯合子 (红色) 和 FAM/HEX 杂合子 (绿色)。无模板对照 (NTC) 集群接近最初位置



扫一扫关注我们
的官方微信