

SNPer™ Hot Start Taq qPCR Kit 使用说明

一、产品组成

组分	P002P	P002PX4
SNPer™ HS Taq DNA Polymerase (5U/μL)	50 μL	50 μL ×4
5X qPCR Buffer*	500 μL	500 μL ×4
ROX Reference Dye (25 μM)	100 μL	100 μL ×4

*包含优化的缓冲体系，dNTPs，Mg²⁺等。

二、产品概述

本产品是专为基因变异检测设计开发的等位基因特异性 qPCR kit，适用于 TaqMan 探针体系，采用的热启动型 SNPer™ 高特异性 Taq DNA 聚合酶对引物/模板错配高度敏感，在等位基因特异性 PCR 中可极大提高区分单碱基突变的能力，从而显著提升 SNP 基因分型的准确度。用户仅需加入引物、荧光探针及模板，即可快速进行 qPCR 反应，操作简便。兼容主流实时定量 PCR 仪器。配合 FAM、HEX/VIC、ROX、Cy5 等多种荧光标记探针可实现多重基因检测，尤其适用于 SNP 基因分型、病原体检测、拷贝数变异分析以及 getPCR 基因编辑检测等需要高特异性扩增的应用场景。

三、保存条件

-20℃保存，应避免反复冻融；可在 4℃短期保存。

四、适用机型

qPCR 仪机型	ROX 添加浓度
Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Roche LightCycler 96, LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler	无须添加 ROX
ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT (Fast); ABI StepOne (Plus)	1/50 体积，终 500 nM
ABI: 7500 (Fast), ViiA 7, QuantStudio 6, 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	1/500 体积，终 50 nM

五、操作说明

1. 引物设计

- ① 建议的 PCR 扩增子大小为 50-120 bp 左右，有利于获得最佳检测灵敏度。
- ② 扩增子区域应尽量避免重复序列、GC/AT 聚集区和二级结构高风险的区域。
- ③ 建议引物长度 18-24 nt，GC 含量 40-60%，尽量避免在引物配对区存在其他干扰性 SNP 位点。
- ④ 设计等位基因特异性引物时，SNP 位点应落在引物的 3'末端，以获得最大的等位基因扩增选择性。
- ⑤ 在检测 indel 的 getPCR ([PMID: 31827197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827197/)) 应用中，需要一对用来识别 indel 的扩增引物，和一对对照扩增子引物，识别 indel 的引物称为值守引物。
- ⑥ 在设计值守引物时，基因编辑切割位点建议落在值守引物 3'端第 3 至第 6 碱基之间，以使其能有效区分 indel 和野生型序列，提高 getPCR 检测 indel 的准确性。
- ⑦ 基因编辑 indel 效率的计算，可参考 excel 文档“getPCR calculation template”。
- ⑧ 请用 DDW 溶解引物，不建议使用 TE 溶液

2. PCR 反应体系 (以 LightCycler 96 为例)

试剂	10 μ L 体系	20 μ L 体系	终浓度
5X qPCR Buffer	2.0 μ L	4.0 μ L	1 \times
PCR 引物 1 (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M
PCR 引物 2 (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M
探针 (10 μ M)	0.1 μ L	0.2 μ L	0.1 μ M
SNPer™ HS Taq (5 U/ μ L)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.1 U/ μ L
DNA 模板	X μ L	X μ L	
ddH ₂ O	To 10 μ L	To 20 μ L	

注意事项:

- ① 通常 0.2 μ M 引物可在各种应用场景下获得令人满意的结果, 如有需要可在 0.1~1.0 μ M 范围内进行调整。
- ② 建议模板用量: 基因组 DNA 10–100 ng; 质粒 DNA 0.01–100 pg。建议将模板 DNA 用 DDW 稀释后再加入反应体系, 可降低小体积操作带来的随机误差, 提高 qPCR 结果的准确度和重复性。
- ③ 依据 qPCR 仪的性能, 通常定量 PCR 反应的 Ct 值在 15-30 区间时性能最佳。

3. PCR 反应程序 (以 LightCycler 96 为例)

Stage		Temperature	Time	Number of cycles
Stage 1	预变性	95°C	3 min	1 cycle
Stage 2	变性	95°C	15 sec	45 cycles
	退火	60°C	15 sec	
	延伸	72°C	20 sec (1 kb/min)	

注意事项:

- ① 95°C 3min 预变性即可恢复酶活并使模板 DNA 解链。
- ② 退火温度可在引物 T_m 值 \pm 3°C 范围内优化, 建议将引物 T_m 设计为 60°C 左右。
- ③ 应根据不同 qPCR 仪器对信号采集时长的要求调整延伸时间, 例如 ABI 7500 通常要求延伸步骤不少于 34 s。

六、其他注意事项

1. 本产品应避免反复冻融, 建议在初次化冻后将产品分装保存。
2. 使用前请完全解冻试剂并轻拨或颠倒混匀, 避免剧烈涡旋, 以防酶活性损失。
3. 在配制反应液的过程中需避免潜在的 DNA 污染, 建议给 qPCR 实验分配专用的移液器, 并使用带滤芯的吸头。
4. 本产品仅限于科研使用, 不可用于临床诊断和治疗。