

SNPer™ Taq TmLADDER™ Kit 使用说明

一、产品组成

组分	P002H	P002HX4
SNPer™ HS Taq (5 U/μL)	50 μL	50 μL ×4
5X qPCR Buffer (HRM)*	500 μL	500 μL ×4
Mineral Oil	2 mL	2 mL ×4

*包含饱和和荧光染料, dNTPs, Mg²⁺等。

二、产品概述

本试剂盒是基于实时荧光定量 PCR 和高分辨溶解曲线分析 (HRM) 实现无探针多重 SNP 基因分型的创新型产品, 其中的饱和荧光染料与 SYBR Green I 有相似的荧光光谱, 可使用 FAM 或者 SYBR Green I 荧光通道检测荧光信号, 采用的 SNPer™ 热启动型高特异性 Taq DNA 聚合酶对引物/模板错配高度敏感, 可完全区分单碱基突变, 显著提高等位基因特异性 PCR 扩增的特异性。试剂盒反应混合液中添加了可消除溶解曲线杂峰的组分, 能够显著提升 HRM 分析的分辨率, 大大提高基因分型的准确性和多重性。在设计等位基因特异性引物时, 将引物 3' 端落在 SNP 处, 并通过在引物 5' 端引入短富 GC 或富 TA 尾对扩增产物的 T_m 值进行调节, 使不同位点的等位基因特异性扩增产物 T_m 呈均匀差异分布, 根据溶解峰的图谱可实现在单个反应体系内同时对多达 3 个 SNP 位点进行检测和分型分析。本产品可广泛应用于各种基因突变检测场景, 尤其适合需要对多位点进行大样本量基因分型的应用。

三、保存条件

-20°C 避光保存, 应避免反复冻融; 可在 4°C 短期保存。

四、适用机型

适用机型

Bio-Rad CFX96, CFX384; Eppendorf Mastercycler ep realplex 2; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Roche LightCycler 96, LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cyclor ABI: 7500 (Fast), 7900HT (Fast); ABI StepOne (Plus), ViiA 7, QuantStudio 6/7 Flex

五、操作说明

1. 引物设计

- ① 建议 PCR 产物大小在 50-120 bp 左右, 扩增子溶解温度 (T_m) 在 70-92°C 之间, 以获得最佳的 SNP 分型能力。
- ② 扩增子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 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, 以获得最大的扩增选择性。
- ⑤ 对于单位点 SNP 检测, 在 T_m 较高的等位基因特异性引物的 5' 端添加 8-12 nt 的富 GC 尾, 另外一条等位基因特异性引物 5' 端添加 6-9 nt 的富 TA 尾 (至少含 5 个 GC), 使两个等位基因特异性扩增子的 T_m 差异大于 1.5°C, 实现等位基因的特异性扩增、检测和识别。对于单个位点的检测, 两个等位基因特异性扩增子的 T_m 差异建议设计为 2.5°C 左右, 以增加区分度。
- ⑥ 在进行多重检测时, 需通过差异化的 GC 或 TA 加尾调整各位点等位基因特异性产物的 T_m, 使其均匀分布且间隔达到 1.5°C 以上, 以实现各等位基因的特异性扩增、检测和识别。
- ⑦ 针对植物基因分型中常遇到的同源基因干扰问题, 可将共同引物设计在同源基因间的差异碱基上, 实现目标基因的特异性扩增和检测。
- ⑧ 请用 DDW 溶解引物, 不建议使用 TE 溶液。

2. 单一 SNP 分型检测体系 (以 LightCycler 96 为例)

试剂	10 μ L 体系	20 μ L 体系	终浓度
5X qPCR Buffer (HRM)	2 μ L	4 μ L	1 \times
Allele 1TA 尾引物(10 μ M)	0.1 μ L	0.2 μ L	0.1 μ M
Allele 2GC 尾引物(10 μ M)	0.05 μ L	0.1 μ L	0.05 μ M
共同下游引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M
DNA 模板	X μ L	X μ L	
SNPer™ HS Taq (5U/ μ L)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.1 U/ μ L
ddH ₂ O	To 10 μ L	To 20 μ L	

注意事项:

- ① 通常 0.1-0.2 μ M 引物可在各种应用场景下获得令人满意的结果, 可根据需要在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
- ② 建议模板用量: 基因组 DNA 5~50 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 在优化反应体系时, GC 尾引物的用量可在对应 TA 引物的 1/2 到 3/4 之间调整。
- ④ 对于不高于 10 μ L 的反应体系, 需按照每 10 μ L 反应体积加入 8 μ L Mineral Oil 封闭液面, 避免蒸发, 增加检测的稳定性和重复性。

3、两重 SNP 分型检测体系 (以 LightCycler 96 为例)

试剂	10 μ L 体系	20 μ L 体系	终浓度
5X qPCR Buffer (HRM)	2 μ L	4 μ L	1 \times
SNP(A) allele1TA 尾引物 (10 μ M)	0.1 μ L	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(A) allele2GC 尾引物 (10 μ M)	0.05 μ L	0.1 μ L	0.05 μ M
SNP(A)下游引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M
SNP(B) allele1TA 尾引物 (10 μ M)	0.1 μ L	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(B) allele2GC 尾引物 (10 μ M)	0.05 μ L	0.1 μ L	0.05 μ M
SNP(B)下游引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M
DNA 模板	X μ L	X μ L	
SNPer™ HS Taq (5 U/ μ L)	0.2-0.3 μ L	0.4-0.6 μ L	0.2-0.3 U/ μ L
ddH ₂ O	To 10 μ L	To 20 μ L	

注意事项:

- ① 如需进行三重 SNP 检测, 可在上述体系的基础上按照相同比例添加相应的引物。
- ② 按 20 μ L 体系, 两重检测使用 0.4 μ L SNPer™ HS Taq 可获得较好的检测效果, 三重检测需要在 0.4-0.6 μ L 左右进行调整。
- ③ 在多重检测优化条件时, 扩增子较长的 SNP 位点, 可适当增加引物用量。
- ④ 对于不高于 10 μ L 的反应体系, 需按照每 10 μ L 反应体积加入 8 μ L Mineral Oil 封闭液面, 避免蒸发, 增加检测的稳定性和重复性。

4、建议的 PCR 程序 (以 LightCycler 96 为例)

Stage		Temperature	Time	Number of cycles
Stage 1	预变性	95°C	3-5 min	1 cycle
Stage 2	变性	95°C	15 sec	36 cycles
	退火	65°C TD 60°C	15 sec	
	延伸	72°C	20 sec	
Stage 3	高分辨率熔解曲线	95°C	60 sec	1 cycle
		40°C	60 sec	
		65°C	1 sec	
		97°C	1 sec	

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± 3 °C 范围内优化，建议将引物 T_m 设计为 60°C左右。
- ③ PCR 采用 touchdown 程序，退火温度从 65°C touchdown 至 60°C (-1°C/cycle)。
- ④ 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。
- ⑤ 可采用 qPCR 仪预设的高分辨率熔解曲线程序采集熔解曲线。
- ⑥ 推荐使用网站产品页面提供的在线工具进行自动化的熔解峰识别与基因型判读。

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. 本产品中含有荧光染料，因此在保存和使用过程中都需要避光。
4. 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。
5. 本产品仅限于科研使用，不可用于临床诊断和治疗。