

SNPer™ Hot Start Taq PCR Kit 使用说明

一、产品组成

组分	P002E	P002EX4
SNPer™ HS Taq (5 U/μL)	50 μL	50 μL ×4
5X PCR Buffer	500 μL	500 μL ×4

二、产品概述

本产品是适用于基因变异检测的等位基因特异性 PCR 试剂盒，PCR 产物直接电泳分析即可实现多重 SNP 基因分型。其采用的 SNPer™ 热启动型高特异性 Taq DNA 聚合酶对单碱基突变高度敏感，极大的提升了 SNP 基因分型的准确性。通过在等位基因特异性引物 5'端添加不同长度的尾序列，并结合下游引物调整各 SNP 位点扩增子的大小，即可通过琼脂糖凝胶电泳对等位基因特异性 PCR 产物进行解析，在单个 PCR 反应中实现多个 SNP 位点的检测和分型。

三、保存条件

-20℃避光保存，应避免反复冻融；可在 4℃短期保存。

四、操作说明

1. 引物设计：

- ① 建议 PCR 产物大小在 60-200 bp 左右，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，在其中一个等位基因特异性引物的 5'端添加 5 nt 的 GC 尾序列，另外一条等位基因特异性引物 5'端添加 20-30nt 的富 TA 尾，使两个等位基因特异性扩增子的长度差异大于 15nt，通过 DNA 电泳实现等位基因的特异性检测和识别。
- ⑥ 在进行多重检测时，扩增子长度大小需差异化设计，使其均匀分布且间隔达到 20nt 以上，以实现各等位基因的特异性检测和识别。
- 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 本产品也可用于基因编辑 indel 子代细胞的鉴定，引物设计方法可参考 P002P 说明书。
- ⑨ 请用 DDW 溶解引物，不建议使用 TE 溶液。

2. 单 SNP 分型反应体系

试剂	20 μL 体系	终浓度
5X PCR Buffer	4 μL	1×
Allele 1 短尾引物(10 μM)	0.3 μL	0.15 μM
Allele 2 长尾引物(10 μM)	0.3 μL	0.15 μM
共同下游引物 (10 μM)	0.6 μL	0.3 μM
DNA 模板	X μL	
SNPer™ HS Taq (5U/μL)	0.4 μL	0.1 U/μL
ddH ₂ O	To 20 μL	

注意事项：

- ① 通常 0.1-0.2 μM 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 μM 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 PCR 结果的准确度和重复性。
- ③ 在必要时，可通过调整长尾引物与短尾引物的比例对 PCR 体系进行优化。

3、两重 SNP 分型反应体系

试剂	20 μ L 体系	终浓度
5X PCR Buffer	4 μ L	1 \times
SNP(A) allele1 短尾引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(A) allele2 长尾引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(A)下游引物 (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
SNP(B) allele1 短尾引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(B) allele2 长尾引物 (10 μ M)	0.2 μ L	0.1 μ M
SNP(B)下游引物 (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
DNA 模板	X μ L	
SNPer™ HS Taq (5 U/ μ L)	0.4-0.6 μ L	0.2-0.3 U/ μ L
ddH ₂ O	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 在优化多重检测体系时,可通过适当增加引物用量来提高较弱扩增子的扩增效率。

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 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	25 sec	
Stage 3	终延伸	72°C	2 min	1 cycle

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 PCR 采用 touchdown 程序,退火温度从 65°C touchdown 至 60°C (-1°C/cycle)
- ④ 需要根据不同扩增子的长度调整延伸时间,延伸速率约为 1kb/min。

五、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 PCR 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。