

2X SNPer™ SYBR Green Master Mix 使用说明

一、产品组成

组分	P003	P003X4
2X SNPer™ SYBR Green Master Mix	1250 μL	1250 μL ×4
ROX Reference Dye (25 μM)	100 μL	100 μL ×4

*包含高特异性 SNPer™ Taq DNA polymerase, SYBR Green I, dNTPs, Mg²⁺等。

二、产品概述

本产品是基于 SYBR Green I 嵌合荧光染料的实时定量 PCR 分析专用预混试剂。SYBR Green I 在游离状态下仅有微弱的荧光,在与双链 DNA 小沟非特异性结合后荧光显著增强。其最大激发波长为 497 nm,最大发射波长在 520nm 处。随着 PCR 扩增产物 DNA 的增加,荧光信号也随之增强,根据达到所设定荧光阈值的循环数,即可实现对样品中目标基因的定量。产品中使用的热启动型高特异性 SNPer™ 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 反应中具有极其优秀的识别、区分单碱基突变的能力,拥有极佳的 PCR 扩增特异性,可在宽广的区间上对靶基因进行准确定量,可用于基因表达定量分析、等位基因特异性 PCR 以及 getPCR 检测基因编辑等多种应用领域。

三、保存条件

-20°C避光保存,应避免反复冻融;可在 4°C短期避光保存。

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 Cyclcr	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
2X SNPer™ SYBR Green Master Mix	5 μ L	10 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
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 根据 qPCR 仪的需要，可在体系中加入 1/50 或者 1/500 体积的 ROX Reference Dye (25 μ M)
- ② 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，可根据需要在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
- ③ 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 结果的准确性和重复性。
- ④ 依据 qPCR 仪的性能，通常定量 PCR 反应的 Ct 值在 15-30 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)	
Stage 3	熔解曲线	95°C	10 sec	1 cycle
		65°C	60 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 \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。
- ④ 可采用 qPCR 仪器预设的熔解曲线程序采集熔解曲线。

六、其他注意事项

1. 为避免反复冻融导致的酶活性下降，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 SYBR Green I，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。