



NuHi® SNP Mix 说明书

产品名称: NuHi® SNP Mix (ROX plus) 货号: NH9216

产品名称: NuHi® SNP Mix (ROX H+) 货号: NH9237

规格: 2X

说明

NuHi® SNP Mix 是采用探针法进行 SNP 分型的专用试剂。

本产品由经化学修饰的 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物及经优化后的缓冲液等组分(模板、探针与引物除外)所组成的混合液体。尤其适用于使用 MGB 探针法对 SNP 位点的分型,分型效果比 TaqMan Master Mix 更优。

在使用时,仅需加入模板、引物及探针,可简化操作过程,缩短操作时间,降低污染。可对 SNP 进行精确分型,可在高通量下准确检测被测样品基因型。

用途

本产品适用于 MGB 探针法的 SNP 基因分型。

储存条件及有效期

避光保存。-20℃长期保存(可稳定保存 18 个月),4℃短期保存。避免反复冻融。

适用仪器

ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene) 等需要 ROX 作为校正荧光的 Real-Time PCR 仪器。

注意事项

以下为使用本产品时的注意事项,请务必在使用前认真阅读。

1、使用时请上下颠倒轻轻均匀混合,避免起泡,并经轻微离心后使用。如果试剂没有混匀,其反应性能会有所下降。请不要使用振荡器混匀。

2、在配制、分装反应液时请一定使用新的(无污染的)枪头、离心管等。

3、在配制 PCR 反应液时不建议每管单独配制。若需同时进行 N 个反应,推荐预先配制 N+1 或 N+2 次 PCR 反应所需各种成分的混合物,同时推荐使用可进行连续滴定的电子移液枪将上述 PCR 混合液分加于每个 PCR 反应管中,以保证较高的实验重复性及可信度。

4、在 PCR 反应时,推荐设置三管重复,且设置 NTC (No template control) 组,即阴性对照组,方便检测体系是否存在污染(不必每次都设置 NTC 实验组)。

5、为获得良好实验结果,保证较好的实验重复性,推荐使用紫外分光光度计对引物的实际浓度进行测定(测定方法见引物浓度测定)。



- 6、请按照本说明书中“引物及探针设计说明”，进行引物设计。
- 7、请按照本说明书中“引物及探针浓度测定”方法，对浓度进行测定。

使用方法

- 1、按照下表配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	试剂终浓度
NuHi® SNP Mix (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10μM)	1.25 μl	500nM
PCR Reverse Primer (10μM)	1.25 μl	500nM
等位基因 1 探针(10μM)	0.5 μl	200nM
等位基因 2 探针(10μM)	0.5 μl	200nM
DNA 模板	1 μl	1-100ng
灭菌水	Up to 25μl	/

注：推荐引物使用浓度为 0.5uM，探针使用浓度为 0.2uM。一般不建议对引物及探针浓度进行优化。

- 2、PCR 反应液配制完成后，上下颠倒混匀并离心，将反应液分装，加入 96 孔 PCR 反应板中，约 2000g/min 转速下离心 1-2min，封口膜封口，置于仪器中进行 PCR 反应。

- 3、Real Time PCR 反应

推荐使用两步 PCR 反应法进行 Real Time PCR 反应。

反应		温度	时间	循环数
荧光定量 PCR	预变性	95°C	2min	1
	变性	95°C	10S	40-50
	退火	60°C	40S	
	延伸			

引物及探针设计说明

推荐按照如下原则设计 PCR 引物，能够提高 PCR 扩增效率和反应特异性。

PCR 扩增产物长度：80-200bp 为最佳(可延长至 300bp)，GC 含量最高可提高至 75%。

引物设计原则如下：

引物长度	17~25 bp
GC 含量	40~60% (45~55%最佳)
Tm 值	尽量保证 Forward Primer 和 Reverse Primer 两引物 Tm 值一致。Tm 值计算软件：Oligo: 63~65°C；Primer Premier 5: 60~62°C；Primer Express: 58~60°C



引物序列	A、G、C、T 整体分布尽量均匀，避免 GC rich 或 AT rich（特别是 3'端），避免连续碱基，尤其是 G。3'端碱基最好为 G 或 C，避免 A 或 T。
二级结构	引物内部避免形成发夹结构及二聚体，两引物间避免有互补序列，二条引物间 3'末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST 检索确认引物的特异性。

探针设计原则：

Tm 值在 65-67°C，5'末端避开碱基 G，SNP 位点尽量处于探针序列中间位置。探针一般标记 FAM、VIC 或 HEX 染料，详细 MGB 探针设计原则可参考 LifeTech 相关要求。

引物及探针浓度测定

部分引物合成厂家提供的引物量与实际量偏差较大。对于普通 PCR，此种偏差对实验不会造成很大差异，但在进行 Real Time PCR 时，此种浓度偏差将给实验带来很大的差异。为此，强烈推荐在进行 Real Time PCR 前，对所用引物的实际浓度进行测定。

具体测定及计算方法为：

1	将引物溶于 TE 缓冲液中稀释 100 倍，紫外分光光度计测定 260nm 吸光值 OD260。
2	计算每条引物的总吸光系数。 总吸光系数=Σ（单碱基吸光系数×引物碱基数目）。
3	按照如下公式计算引物浓度(μM) 由 OD260=总吸光系数×光程×浓度 C/100 得到：浓度 C=100×[OD260/(总吸光系数×光程)]

引物浓度计算实例：

在该例中，引物序列为 CGTACTCGTTCGTGCTGC，引物浓度是如此测定并计算的。

将引物溶解于 TE 缓冲液中并稀释 100 倍。

碱基类型	吸光系数	碱基数目	总吸光系数
A	15200	1	15200
C	7050	6	42300
G	12010	5	60050
T	8400	6	50400
总计	—	—	167950

紫外分光光度计测定 OD260=0.13

总吸光系数=167950 M⁻¹cm⁻¹



比色皿光程=0.3cm

将上述数值带入公式 $OD_{260} = \text{总吸光系数} \times \text{光程} \times \text{浓度} / 100$ 中为:

$$0.13 = 167950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0.3\text{cm} \times C / 100$$

则 $C = 258\mu\text{M}$

联系方式

苏州新海生物科技股份有限公司 NuHigh Biotechnologies Co., Ltd

地址: 苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米科技园 C8 楼 301 单元

邮编: 215123

电话: 0512-69561912

传真: 0512-69561913

网址: www.nuhighbio.com