

AccuProbe SNP Genotyping Master Mix

货号：A611

保存：-20°C避光保存两年

货号	规格
A611-01	5 ml
A611-02	5×5 ml

【产品概述】

本产品是一种适用于探针法进行单核苷酸多态性（SNP）分型检测的试剂。核心组分是基于化学法修饰的热启动DNA聚合酶，配合最优的反应缓冲液，实现了对低浓度或复杂模板的快速、准确分型。本产品是2×预混液，只需额外添加模板、引物、探针、ROX Reference Dye（根据qPCR仪选择）和水，使其工作浓度为1×，即可进行SNP分型检测。同时，本产品使用UDG酶和dUTP有效防止PCR产物的交叉污染，数据更准确。

- 使用化学法修饰的热启动酶，提高灵敏度，增强特异性
- 使用dUTP和UDG酶，可有效排除先前扩增产物的交叉污染，数据更准确
- 针对SNP检测优化的反应缓冲液，增强特异性，提高扩增效率，重复性好，可信度高
- 配有适用于不同机型的ROX Reference Dye（调整PCR加样误差引起的管间差异），数据准确

【适用范围】

本试剂用于DNA样本的扩增定量，可以扩增所有物种来源的DNA，样本类型可以是基因组DNA、质粒DNA、cDNA、λDNA等。

【产品组成】

Component	A611-01 (500rxn/20 µl reaction)	A611-02 (2500rxn/20 µl reaction)
2×AccuProbe SNP Genotyping Master Mix ^a	4×1.25 ml	5×A611-01
50×ROX Reference Dye I ^b	200 µl	
50×ROX Reference Dye II ^b	200 µl	

- a. 包含热启动酶、UDG酶、dNTPs、dUTP、 Mg^{2+} 等
- b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同机型ROX Reference Dye使用情况参见下表：

无需添加 ROX Reference Dye	Bio-Rad iCycler CFX96, CFX384, iQ, iQ5, MyiQ, Opticon, Opticon 2, MiniOpticon, Chromo4; Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR; Takara TP-800.
添加ROX Reference Dye I (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne, StepOnePlus.
添加ROX Reference Dye II (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3, QuantStudio 5, QuantStudio 6, Stratagene MX3000P, MX3005P, Mx4000.

【推荐qPCR体系（以20 μ l反应体系为例）】

Component	Volume
2×AccuProbe SNP Genotyping Master Mix	10 μ l
10 μ M Forward Primer	1.8 μ l
10 μ M Reverse Primer	1.8 μ l
10 μ M TaqMan MGB Probe A	0.4 μ l
10 μ M TaqMan MGB Probe B	0.4 μ l
50×ROX Reference Dye (optional)	0.4 μ l
Template DNA ^a	Variable
ddH ₂ O	Up to 20 μ l

- a. 模板DNA推荐用量为1-20 ng
- 为了使用方便可以把引物和探针预混成20×Assay Working Stock，推荐引物反应终浓度为900 nM，探针反应终浓度为200 nM
 - 每次实验均需要设置一定数目的无模板对照（NTC）和已知基因型的阳性对照
 - 引物和探针可以购买TaqMan Genotyping Assay或者通过专业的软件（例如Primer Express Software）进行设计

【PCR条件】

Step	Temperature	Duration	Cycles
UDG-pre-treatment	25°C	3 min	1
Enzyme activation	94°C	10 min	1
Initial-denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	40 - 45
Annealing/Extension ^{a,b}	60°C	30 sec	

a. 退火/延伸温度根据不同的引物和探针需要进行优化，推荐优化的温度范围为58°C - 65°C。退火/延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒

b. 如果PCR扩增完成后无法立即进行终点信号采集，可以将样品保存在4°C避光环境中，存放时间少于72 h，离心后进行终点信号采集

【注意事项】

- 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐分装后使用
- 使用前请上下颠倒混匀预混液，预混液经混匀瞬时离心后即可使用
- 2×AccuProbe SNP Genotyping Master Mix于-20°C保存时，有时会形成沉淀。在室温短时间放置后，涡旋混匀即可完全溶解。确保试剂混合均匀后再使用
- 由于本品检测灵敏度极高，在配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液器，避免污染

【常见问题与解决方案】

问题描述	原因	解决方案
NTC信号偏高	试剂存在污染	更换引物、探针、SNP试剂、水以及所有耗材等，重复实验
	仪器存在荧光物质的污染	清洁仪器
	仪器长时间未校准	重新校准仪器
无信号、Rn值差或信号低	循环程序错误	优化循环程序
	热启动DNA聚合酶未激活	确保循环程序包含热启动DNA聚合酶激活步骤（94℃，10 min）
	样品加入错误	确保引物、探针、模板和扩增试剂均加入PCR反应孔
	PCR效率较低	避免引物和探针反复冻融；PCR产物长度>300 bp，增加退火/延伸时间
	模板质量差	检查模板浓度、储存条件和模板质量； 确保所有使用试剂不含核酸酶； 确认模板中无PCR抑制剂
	模板加入量过低	提高DNA模板加入量或者增加PCR循环数
	探针设计错误	确认引物中有无SNP位点，如有必要重新设计引物
	检测通道选择错误	确认报告基团的采集通道是否正确，并重新进行终点信号采集
信号杂乱无法成簇或聚簇效果差	模板中存在抑制剂	稀释模板或重新制备无抑制剂的DNA模板
	模板加入量过低	提高DNA模板加入量或者增加PCR循环数
	试剂蒸发	加样完成后确保PCR孔密闭，PCR混样完成后避免长时间存放，尽量立即上机采集信号
	试剂过期	使用新批次试剂重复实验
	存在气泡	离心去除气泡
	检测通道选择错误	确认报告基团的采集通道是否正确并重新进行终点信号采集
	未选择ROX通道	在需要进行ROX校正的仪器上勾选ROX信号
簇与簇之间信号相距太近	模板降解	重新制备高质量模板
	探针降解或设计不当	使用新批次的探针进行重复实验； 重新设计探针

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。
在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。