

Version 1

Code No. AG12803

GenDiff SNP 预混型探针法 qPCR 试剂盒 (ARMS)

GenDiff SNP Premix Probe qPCR Kit (ARMS)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

➤ 产品概述

本产品是结合 ARMS-PCR 方法及 Taqman 探针法进行 SNP 基因分型检测的试剂盒。本产品是一种 2X 预混型试剂，仅需加入引物探针、模板及 RNase free water 即可，反应液配制十分简单。本产品对 PCR 反应体系进行了优化，采用性能优越的 *Accurate TaqHS* DNA Polymerase，扩增不同复杂度的模板均具有较高的扩增效率及灵敏度；同时还添加了在常温状态下能够抑制 DNA 聚合酶活性的单克隆抗体，可有效抑制引物二聚体的形成及非特异性扩增，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，非常适合进行 SNP 基因分型检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG12803 (500 rxns / 20 μ l)
2X Probe qPCR Mix (ARMS) *1	1 ml x 5 pcs

*1: 溶液在-20℃存放时可能会产生白色的沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿涡旋振荡。

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品操作简单，是一种 2X 预混液，反应液配制简单，仅需加入引物探针、模板及 RNase free water 即可进行 qPCR 反应。
2. 本产品结果分析简便，通过分析两种基因型的 CT 差值即可进行基因分型，分析简单、结果可靠。
3. 本产品对 PCR 反应体系进行了优化，具有灵敏度高、分型性能优、通用性好等特点。

➤ 实验原理

ARMS-qPCR 探针法原理

ARMS-qPCR 探针法是结合 ARMS-PCR 法和 Taqman 探针法进行 SNP 基因分型检测，从而判断不同基因型（野生型、杂合型、突变型）的方法。ARMS-PCR 即扩增阻滞突变系统 PCR (Amplification Refractory Mutation System PCR, ARMS-PCR)，其基本原理是通过引

物 3' 末端引物设计控制等位基因特异性延伸，从而将野生型等位基因和突变型等位基因区分开来。

引物设计时包括两条正向引物 F1/F2、一条反向引物 R 和一条探针，等位基因两条正向引物中 3' 末端核苷酸不同，分别对野生型等位基因和突变型等位基因特异。扩增时，与模板不能完全匹配的正向引物将不能完全形成互补碱基对，形成错配，延伸受阻不能产生 PCR 产物；而与模板匹配的引物体系则可以扩增出相应的 PCR 产物，与 PCR 产物结合的探针即被切割产生荧光信号，通过分析两条正向引物对应基因型的荧光数据及 CT 差值，可对不同样本进行 SNP 分型检测（图 1）。

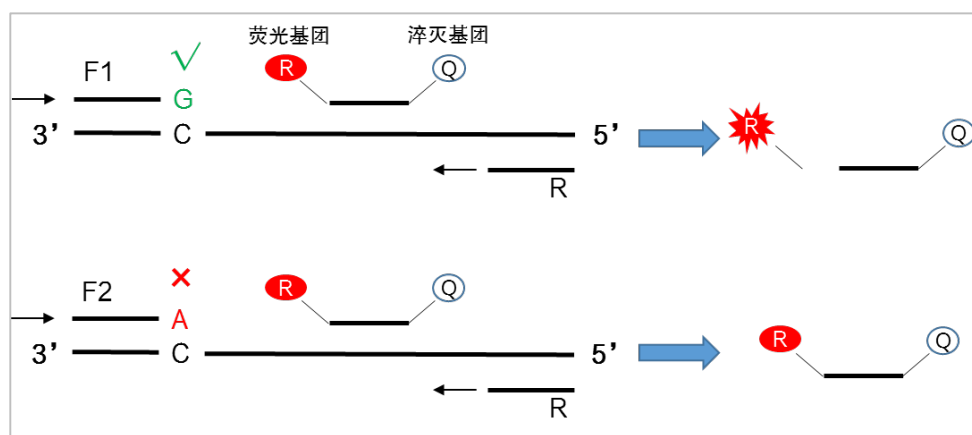


图 1 ARMS-qPCR 探针法原理图

➤ 使用前注意事项

1. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 产品-20℃存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。
3. 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
4. 所有反应预混液建议在冰上进行配制。
5. 请保持实验区域洁净，以避免核酸酶污染。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

1.5 ml 离心管（RNase-free）、定量 PCR 管（RNase-free）、枪头、冰盒。

2. 仪器：

定量 PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机。

➤ 引物设计原则

1. 进行 ARMS-qPCR 探针法实验时，一般设计两条正向引物、一条反向引物和一条 Taqman 探针；保证两条正向引物 3' 端最后一个碱基对应 SNP 位点碱基，分别对应野生型和突变型基因 SNP 位点。
2. 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40~60% 之间。
3. 建议正反向引物 Tm 值在 50-70℃，两引物 Tm 值相差不超过 5℃。
4. 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
5. 引物 3' 端避免出现发夹结构。
6. 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。

➤ 操作步骤

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

1. 按照下表配制 PCR 反应液^{*1}:

(分别使用 Primer F1 和 Primer F2 配制两份反应液，其余组分保持一致)

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X Probe qPCR Mix (ARMS) ^{*2}	10μl	25 μl
Primer F1 or Primer F2 (10 μM) ^{*3}	0.2 μM	0.2 μM
Primer R (10 μM) ^{*3}	0.2 μM	0.2 μM
Probe (10 μM) ^{*4}	0.4 μM	0.4 μM
Template ^{*5,*6}	≤100 ng	≤250 ng
RNase free water	Up to 20 μl	Up to 50 μl

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM，当反应结果不好时可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*4: 探针浓度与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关，请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。通常探针终浓度可在 0.1 ~ 0.5 μM 范围内进行调整。

*5: 在 20 μl 体系里，DNA 模板添加量通常不超过 100 ng。

*6: 为提高实验的准确度及重复性，建议将模板 DNA 用水稀释后加入 2-5 μl 样本。

2. qPCR 反应条件（两步法 PCR 反应程序^{*1}）

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec ^{*2}	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 ^{*4}	60°C	30 sec ^{*3}	

*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件；如果引物 Tm 值较低，导致两步法扩增效率较差，可采用三步法进行 PCR 扩增。

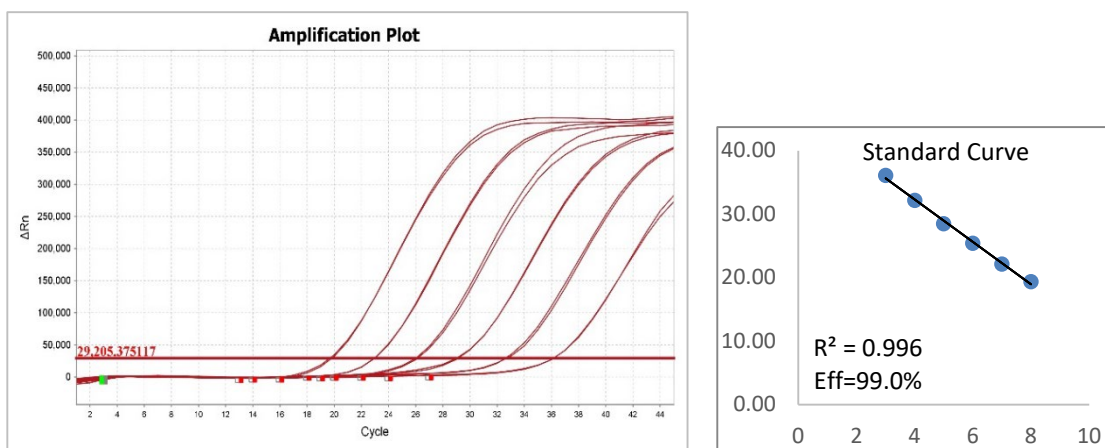
*2: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以在 30 sec~2 min 内延长预变性时间。

*3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下，扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求；如需提高反应特异性，可适当提高退火温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增（三步法 PCR 反应程序可参考附录）。

*4: 此步骤进行荧光信号值采集。

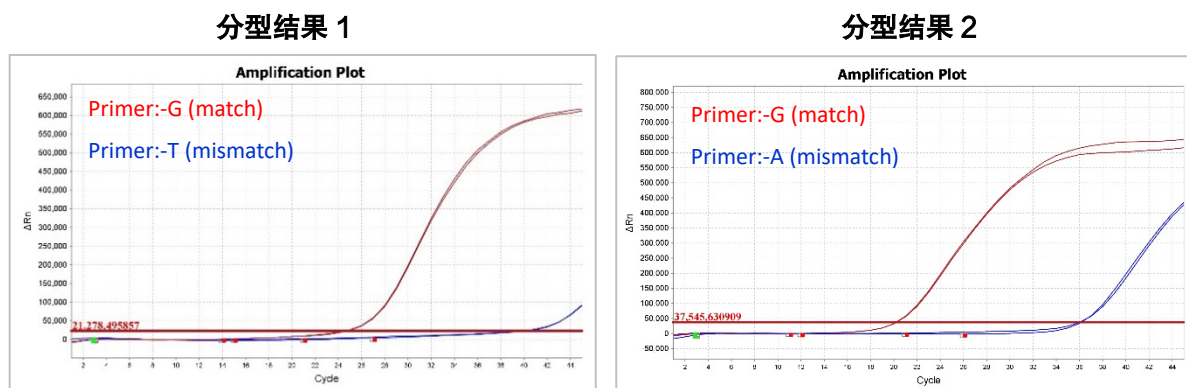
➤ 实验例

1. 使用本产品进行荧光定量 PCR 检测小鼠 *GAPDH* 基因，模板添加量为 100ng–1pg，cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）Ver.2 (Code No. AG11728)。所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems，结果如下：



- 结果如上图：1. 工作曲线 $R^2=0.996$ ，扩增效率 99%；
2. 可以在宽广的模板范围内进行准确定量，100ng–1pg 浓度范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。

- 使用本产品进行不同样本不同基因型（野生型、突变型）检测，所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems，通过比较 Ct 值差异能准确将不同类型的模板进行区分，结果如下：



- 结果如上图：1. 分型结果 1 中，根据扩增曲线发现野生型模板正常扩增，突变型模板无明显起峰，能显著区分突变型与野生型；
- 分型结果 2 中，根据扩增曲线发现突变型与野生型 Ct 差值 ≥ 14 ，能显著区分突变型与野生型。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高：可能会导致扩增结果 Ct 值较小，荧光信号值较高，扩增曲线异常。可适当降低模板量。
- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，可能会导致模板加样体积不准，实验重复性差。可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：含有抑制 PCR 反应的物质，可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 合适的引物

- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好，可适当降低引物浓度。

- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。

4. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：可能会导致反应特异性不好，或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：可能会导致扩增效率低，无扩增曲线。可适当降低退火温度。

5. 实验细节

- ❖ 添加样本时，尽量避免样本间的错误交叉及样本污染；
- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡；
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确；
- ❖ 实验过程中应穿戴好实验服，佩戴好一次性的口罩、手套。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	45
退火	55°C	30 sec	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	

*1：此步骤进行荧光信号值采集。