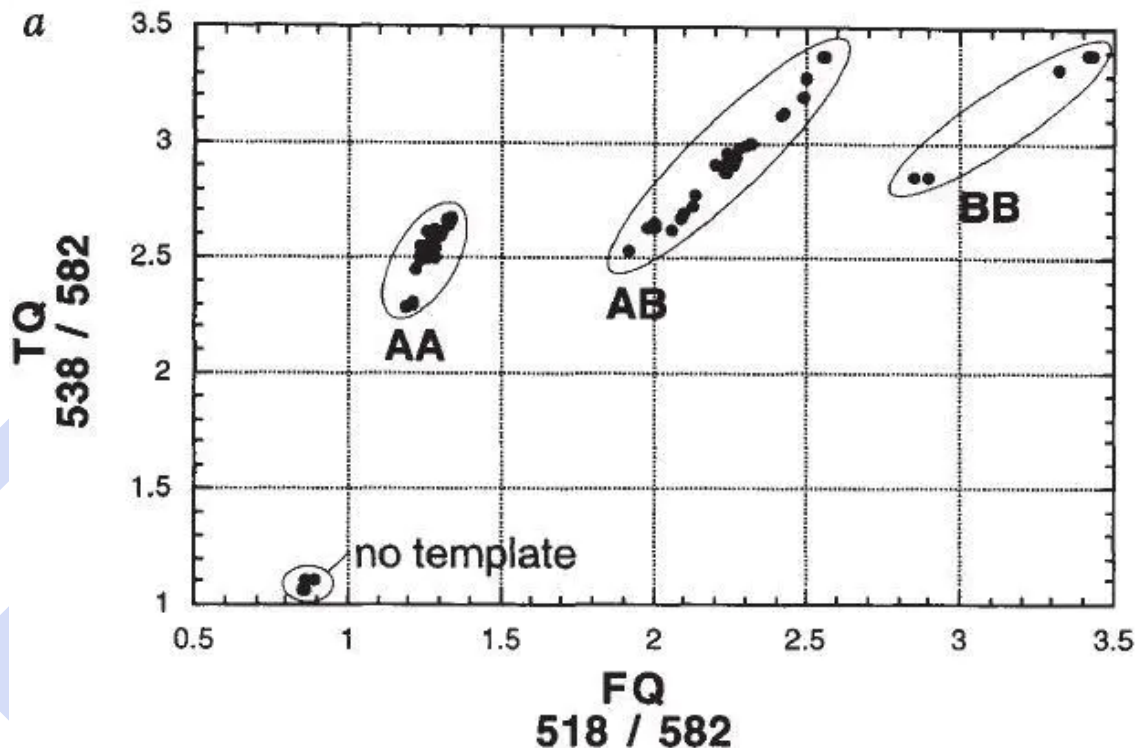


## SNP 试剂盒基本原理和常见问题

### Taqman 探针法 SNP 分型的原理

qPCR 法基因分型的基本原理是：3'-末端不匹配的引物无法正常扩增靶标基因。qPCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一对特异性的荧光探针。如果探针与目标序列中存在错配碱基，就会影响其释放荧光的强度，可以通过检测反应液中的荧光强度比值确定基因型。

利用不同荧光标记的探针检测 SNP 的方法，分别针对两种基因型设计两条不同荧光标记的探针，并设置纯合基因型的对照，随着 PCR 扩增如果荧光信号靠近 A 参照代表 A 基因型，靠近 B 参照代表 B 基因型，如果位于 A 和 B 之间则为杂合型（如下图）。



总结：Taqman 探针法 SNP 分型就是通过两种不同荧光的比值，将同一批实验中的样本分成三个区，进而转化成三种不同基因型。

对于三种基因型均匀分布的 SNP，分区界面应呈现明显的蓝、绿、红三个区域。蓝色代表 FAM 标记的纯合基因型，绿色代表杂合型，红色代表 VIC 标记的纯合基因型。

对于三种基因型不均匀分布的 SNP，特别是 90% 以上的是某单一基因型，分区界面可能只出现一种颜色区域。软件自行分析数据时，可能出现误差，需要人工校正。

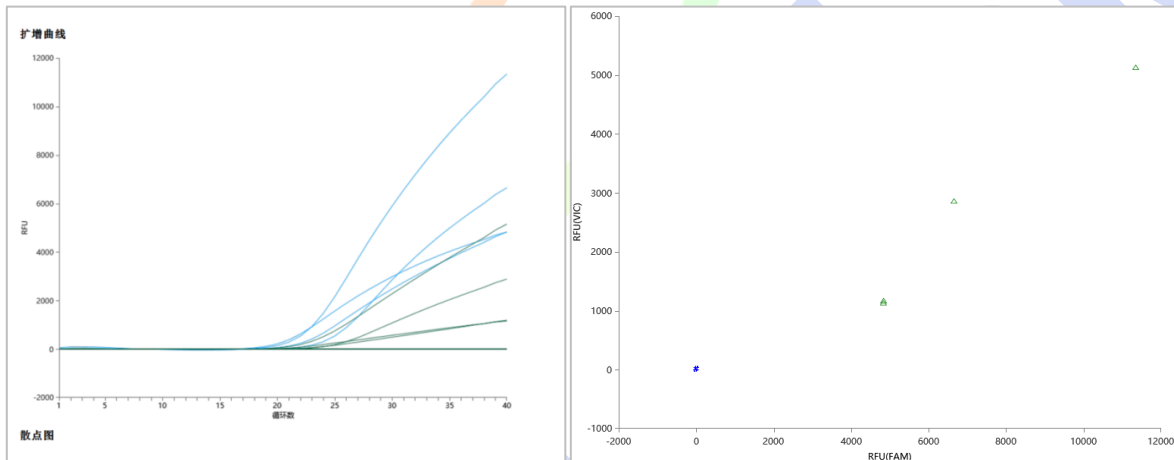
当同一批实验样本较少时，软件无法通过统计的方法，计算出三个明确的分区，也有可能出错。故用相同少数的几个样本进行多次重复实验时，由于荧光比值有细小差异，故也有同一个样本被系统判读成不同结果。

## 针对使用人员的常见问题，建议如下：

### 1. 使用人员的同一批样本，DNA 质量和浓度差异较大

导致不同样本 Ct 值相差 4 左右，同时导致相同基因型的不同样本没有聚到同一区域。

切记不要有个别样本浓度特别高或者质量特别好，会荧光信号特别高，导致其它样本被压缩到相同区域，无法分区。



建议使用人员在实验前，对 DNA 的质量和浓度进行仔细确定。建议每个反应的 DNA 投入量为 30-60 ng。同时，如果是现抽提的 DAN 立即进行 qPCR，可以用纯水溶解，不必用 TE。

### 2. 样本数量

建议使用人员一批不要只做几个样本，数量较少的样本软件无法通过统计的方法计算出三个明确的分区，也有可能出先判别错误。如果必须做少数几个样本，建议每次实验至少放置一个杂合型、一个纯和型的已知参考品做参考，实验样本参考已知样本的落区来判断基因型。

### 3. 质量控制

按照技术要求，该技术方法为定性实验，须要加入参考品和阴性对照。参考品为基因型已经确认的该 SNP 三种基因型，可以是线性双链 DNA、质粒、已知序列的人体样本 DNA。参考品每个基因型的均须要设置，包括两个纯合和一个杂合。阴性对照为水。分析时以参考品、阴性对照为质量控制和分析控制标准。

#### 4. 机器选择与分析

建议采用 Applied Biosystems (ABI) 的 qPCR 仪结合 TaqMan® Genotyper Software 软件进行分析。Applied Biosystems (ABI) 的 qPCR 仪一次可以进行少数样本的实验。因为 TaqMan® Genotyper Software 软件可以将不同批次的实验汇总在一起进行分区分析。

天隆的 qPCR 仪做 SNP 分型并不是最优的选择，其软件对 SNP 分型的算法并未优化。

BioRad 的 qPCR 仪也不是好的选择，其软件分析往往也会出现分型错误的问题。

其他型号的机器需要自行判断是否合适。

若机器本身自动的分析软件给出的结果与参考品、阴性质控的不一致，需要根据质控数据自行手动分析，分析方法参考相关专业资料、教科书等。

附：ABI 7500 实验上机设置及数据分析供参考。

#### 5. 孔板设置

上机时若一板未上满，需要按照上样孔的位置进行机器设置，未上样的位置不进行信号采集。过多的噪音信号可能干扰数据分析，导致结果混乱。

#### 6. 每次实验仅使用一个试剂盒

由于终点法的荧光数据分析方法不同于定量 PCR，无关的信号会影响结果分析，所以不同的试剂盒不能同时上机，需要分开两块板分别分次上机检测。

#### 7. 体系选择

为了使结果更稳定，数据更直观，可以考虑用以下体系进行实验：

PCR 反应体系 (20  $\mu$ l) : (扩增程序保持不变)

名称	体积 ( $\mu$ l)
RealFAST Probe PCR mix	10
Primer & Probe premix	2.5
Lo-ROX (50 $\times$ )	按机器品牌与型号添加
DNA	2 (30 - 60 ng)
ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

## 8. 扩增程序选择

若因为样本质量或浓度等原因导致扩增困难，可以考虑使用以下程序进行上机。

项目	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	3 min	1
变性	95 °C	20 sec	
退火	57 °C	20 sec	43
延伸	72 °C	30 sec*	
结束	72 °C	3 min	

注：\*处进行荧光信号采集。

## 9. 注意

刚开始接触此技术的操作人员，需要学习掌握相关技术的知识和分析方法，试剂盒基于这些技术开发，不对技术和分析做更多描述和支持。

## 10. 其他

其他注意事项请仔细参考说明书中所描述的内容。