

AQP™基因分型系统引物设计原则

AQP™基因分型系统的SNP-Specific Primers由3个引物构成，分别为两个等位基因特异的正向引物(Alele-specific forward primer 1 and 2)和一个通用反向引物(Common reverse primer)组成。3个引物的设计原则如下：

1. 两个正向引物3'端的最后一个碱基分别为两等位基因的等位位点（如表1所示）；此外，正向引物3'端的其他碱基不需要引入任何人工突变位点。
2. 两个正向引物的退火温度不宜过低，应尽量控制在59°C-65°C之间，以61°C-63°C 最为合适；反向引物退火温度控制在62°C-65°C为宜，长度22-27个碱基较好。
3. 为保持A(T)/G(C)型SNP两正向引物扩增温度相对一致，可以在G(C)等位基因扩增引物的5'端去掉一个碱基或者在A(T)等位基因扩增引物的5'端增加一个碱基（如表1所示rs671-f1比rs671-f2多一个碱基）。
4. 单条引物内部不能出现连续4个或4个以上的碱基互补序列，正向引物与反向引物之间不能出现连续5个或5个以上的碱基互补序列。
5. PCR扩增长度不宜大于120 bp。
6. 正向引物设计好之后，需要在两个正向引物5'端分别加上一个不同的接头序列，两个接头序列能够分别被FAM和HEX标记的荧光探针识别，在PCR扩增反应过程中产生荧光信号。两接头序列如表1蓝色和红色字母所示。

北京嘉程生物科技有限公司

北京市门头沟区石龙经济开发区永安路20号3号楼A-7511室

产品和技术咨询电话：13581582894

邮箱：jiachengbio@126.com



7. 通用反向引物必须具有靶序列的扩增特异性，不能对SNP序列的同源序列进行扩增。如果SNP序列存在同源序列，通用反向引物必须位于序列差异区（图1）。如果通用反向引物与正向引物组合能够扩增靶序列的同源序列，则会导致错误结果或者无法对相应SNP位点分型。

表1. 人类乙醛脱氢酶基因ALDH2变异位点rs671的AQP™引物序列

SNP Specific Primer	引物序列
rs671-f1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACGGGCTGCAGGCATACACTA
rs671-f2	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCGGGCTGCAGGCATACACTG
rs671-r	GGTCCCACACTCACAGTTTTCACTT

Allele G	GTATGTCAACTCAGGGCAGCCTTGGGCTATAGCCATCACCCCAACCTGTGAAATCCTACCTTGT
Forward Primer 1	...TGTCAACTCAGGGCAGCCTTGGG.....
Allele C	GTATGTCAACTCAGGGCAGCCTTGGGCTATAGCCATCACCCCAACCTGTGAAATCCTACCTTGT
Forward Primer 2	...TGTCAACTCAGGGCAGCCTTGGC.....
Homo Seq	GTATGTCAACTCAGGGCAGCCTTGGGCTATAGCCATCAACCCCAACCTGTGAAATCCTACCTTGT
Reverse PrimerCCCCAACCTGTGAAATCCTACC.....

图1. SNP位点特异扩增序列设计示例。Reverse Primer的3'端位于同源序列的差异区。

北京嘉程生物科技有限公司

北京市门头沟区石龙经济开发区永安路20号3号楼A-7511室

产品和技术咨询电话：13581582894

邮箱：jiachengbio@126.com

