

SatGreen qPCR Master Mix for HRM

(2×, EvaGreen)

产品货号: BN12013

产品规格: 20 μ L×100T, 20 μ L×500T

储运条件: -20℃ 避光保存, 有效期见外包装。冰袋运输。

产品介绍

本产品是一款适用于实时荧光定量 PCR 和高分辨率熔解曲线分析的专业试剂。其核心成分 SatGreen 是专为 qPCR 和高分辨率熔解曲线分析设计的新型 dsDNA “饱和染料”。它通过“按需求释放”机制, 选择性结合双链 DNA, 能极大降低对 PCR 扩增的抑制, 使双链 PCR 产物结合量饱和, 且不会出现 SYBR Green 的染料重排问题, 可精准区分扩增产物间单个碱基差异。

该产品用途广泛, 可用于已知 SNP 分析、未知突变基因扫描等。此外, 产品中含 ROX Reference Dye, 能消除信号本底, 校正孔间荧光信号误差, 方便客户根据不同型号荧光定量 PCR 仪, 选择对应浓度使用。

应用范围: 实时荧光定量 PCR 高分辨率熔解曲线分析

产品特点

高灵敏度: 精准探测 DNA 序列细微差异, 能识别单碱基变化, 适合 HRM 分析;

低 PCR 抑制: 对 PCR 扩增反应抑制作用小 (远小于 SYBR Green I);

高安全性: 几乎不可穿透完整的细胞膜, 无致突变性, 比 SYBR Green I 更安全;

兼容性好: 与 SYBR Green I 光谱相似, 可直接替代无需更换仪器和更改步骤。

产品参数

$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 500/530 \text{ nm}$ (结合 DNA)

$\lambda_{\text{abs}} = 471 \text{ nm}$ (未结合 DNA)

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

产品组分

组分	20 μ L $\times$ 100T	20 μ L $\times$ 500T
A. SatGreen Master Mix for HRM (2 $\times$)	1 mL	5 $\times$ 1 mL
B. 10 $\times$ ROX reference dye	0.2 mL	1 mL

组分 A 包含 SatGreen 染料, dNTP, PCR buffer (含 Tris 和 MgCl₂), 热启动 Taq 聚合酶。

注意事项

1. 本产品中含有荧光染料, 保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
2. SatGreen Master Mix for HRM (2 $\times$) 在 -20 $^{\circ}$ C 不会冷冻, 若发现冻上, 将其置于室温融化, 并轻轻涡旋混匀, 后续所有实验应在冰上操作。
3. 使用前请上下颠倒轻轻混匀, 请不要使用振荡器进行混匀, 尽量避免出现泡沫, 并经瞬时离心后使用。
4. 引物纯度对反应特异性影响很大, 建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。
5. 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

操作步骤

1. 在 PCR 管中制备反应液 (置于冰上进行配制)。

反应组分	20 μ L 反应体系	终浓度
SatGreen Master Mix for HRM (2 $\times$)	10 μ L	1 $\times$
正向引物 (10 μ M) (见注 1)	1 μ L	0.25 μ M
反向引物 (10 μ M) (见注 1)	1 μ L	0.25 μ M
模板 (见注 2)	-	-ng
10 $\times$ ROX reference dye (见注 3)	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	Up to 20 μ L	-

- 注：1) 引物终浓度可根据情况在 0.2~0.5 μM 间调整，通常为 0.3 μM ；
- 2) 由于 HRM 具有很高的灵敏性，尽量保持不同样本之间有相同的模板量（1-50 ng 基因组 DNA 或 1-50 pg 微生物 DNA），同时使所有样本的 Ct 值都低于 30（21-25 较佳），样本之间的 Ct 值差异不应超过 3。
- 3) 几种常见仪器的匹配 ROX Reference Dye 浓度见下表：

仪器	推荐 ROX 使用浓度	终浓度
ABI 7900 HT	High ROX 1 $\times$ （终浓度）	1 $\times$ （例如：2 μL ROX/20 μL 体系， 5 μL ROX/50 μL 体系）
ABI 7500 Fast	Low ROX 0.05~0.1 $\times$ （终浓度）	0.1 $\times$ （例如：按 1 : 10 稀释 10 $\times$ ROX；2 μL ROX/20 μL 体系， 5 μL ROX/50 μL 体系）
Roche LightCycler96/ Roche LightCycler 480/Qiagen Roter Gene	No ROX	无需添加

2. 设置反应程序，将反应液放入仪器，运行程序扩增。

A. 两步法

程序	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95℃	120 sec	1	否
变性	95℃	10 sec	35	否
退火&延伸	60℃	30 sec（ 见注 1）		是
熔解曲线分析（ 见注 2）				

B. 三步法

程序	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95℃	120 sec	1	否
变性	95℃	10 sec	35	否
退火	60℃	15 sec		否
延伸	72℃	30 sec		是
熔解曲线分析（ 见注 2）				

注：1) 两步法适用于大多数引物 T_m 为 60℃ 的扩增；

2) 三步法适用于退火温度低于扩增温度的扩增。如扩增片段引物较长，易引发非特异性扩增，可提高延伸温度来降低这种情况。

3) 在熔解曲线分析时，一般设置为 0.02~0.1℃ 收集一次荧光。

4) 先使用 60℃ 30 sec 进行扩增，如出现非特异性扩增，可尝试在 60-66℃ 范围内优化，提高反应特异性。

5) 进行初次熔解曲线分析前，需确定每组 PCR 产物的 T_m 值。进行熔解曲线分析时，熔解曲线设置的温度范围应从 65℃ 到 95℃，涵盖前期确定 T_m 值整个范围。确定熔解温度 T_m 后，在后续熔解曲线分析实验中，可以设置熔解程序的最高熔解温度比所有 PCR 产物的最高熔解温度高 5℃，最高熔解温度比所有 PCR 产物的最低熔解温度低 5℃，这样可以减少 HRM 分析所需的时间。

FAQ

1. 问：基因组 DNA 模板量和纯度有什么要求？

答：在 20μL 反应体系中，基因组 DNA 模板量一般小于 100 ng。模板纯度要求为 OD_{260}/OD_{280} 在 1.6 - 2.0 之间， OD_{260}/OD_{230} 在 1.5 - 2.0 之间。

2. 问：进行 HRM 分析时，对样品的基因组 DNA 纯化方法有什么建议？

答：尽可能对 HRM 分析的所有样品使用相同的基因组 DNA 纯化方法，避免由于不同

提取方法中使用的洗脱缓冲液的不同组成而引入差异。

3. 问：可以用 50 μ L 体系吗？

答：HRM 具有很高的灵敏性，在条件允许的情况下可使用 50 μ L 反应体系，大的反应体系可提高反应重复性，减少实验误差对熔解曲线的负面影响。

4. 问：HRM 分析中，引物设计有哪些要点？

答：较短的 PCR 产物可提高 HRM 的分辨率。设计 PCR 引物时，尽量保持产物长度在 80 - 300 之间。对于单核苷酸多态性 (SNP) 分析，建议使用 80 - 120 个碱基对的 PCR 产物，且 SNP 位点尽量处在 PCR 产物序列中间位置。虽然较大的产物也能分析，但通常分辨率较低，因为单个碱基的变化对 100 个碱基对的 PCR 产物的熔解行为的影响比对 350 个碱基对的 PCR 产物的影响更大。

5. 问：所有检测实验都需要设置无模板对照吗？为什么？

答：所有检测实验中都应包括一个无模板对照 (NTC)，可检测潜在的污染。

6. 问：单核苷酸多态性基因分型实验，对基因组 DNA 对照有什么要求？

答：对于单核苷酸多态性基因分型实验，每种可能的基因型（野生型、杂合子、变异型）至少需要一个已知基因型的基因组 DNA 对照。

7. 问：扩增时对 PCR 循环次数有什么要求？

答：扩增时要设定足量的 PCR 循环次数，使所有样本都达到 PCR 的平台期，以确保产生足量的扩增产物用于 HRM 分析。因为 PCR 产物量会影响 PCR 产物的熔融温度。