

产 品 说 明 书

2×AugeGreen Master Mix for HRM

产品货号：S2013S, S2013L

产品规格：20 μL×100T, 20 μL×500T

产品内容：

组分	S2013S (20 μL×100T)	S2013L (20 μL×500T)
A. 2 ×Master Mix	1 mL	5×1 mL
B. 10 ×ROX reference dye	0.5 mL	1 mL

组分 A 包含 AugeGreen dye, dNTP, PCR buffer (含 Tris 和 MgCl₂)，热启动 Taq 聚合酶；组分 B 是 10 ×ROX 参照物。

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)

储存条件

-20°C 避光保存，有效期见外包装。使用前，将产品室温下解冻，并轻轻涡旋混匀，解冻后所有实验应在冰上操作。使用后，该产品可以重新冷冻储存。

产品介绍

AugeGreen Master Mix for HRM (2×) 是一款用于实时定量 PCR 和高分辨率熔解曲线分析的专业试剂盒。其中 AugeGreen 是一种新型的专为 qPCR 和高分辨率熔解曲线分析设计的 DNA 结合染料，它通过一种“按需求释放”的机制，极大地降低了对 PCR 扩增的抑制性，可使双链 PCR 产物的结合量达到饱和状态，所以称为“饱和染料”，不会产生 SYBR Green 的染料重排现象，能够很好的区分扩增产物之间单个碱基的差异。AugeGreen 的另一个优点是它的安全性。

本产品包含一种高保真的热启动 Taq DNA 聚合酶，该酶经过化学修饰，常温下没有活性，可避免非特异性产物的扩增。本试剂盒可用于已知 SNP 分析，未知突变基因扫描

和甲基化检测等。

AugeGreen 的突出优点是它的安全性。常规 DNA 结合染料存在潜在致突变性。我们研发的 AugeGreen 染料，不能透过细胞膜，因而不能与活细胞的基因组 DNA 结合，确保了其安全性。然而，常见的一些 PCR 荧光染料都可以在几分钟内进入细胞，如 SYBR Green I。

使用方法

1. 取出 AugeGreen Master Mix for HRM (2×)，引物，模板，RNase-free 水，恢复至室温，轻轻涡旋，充分混匀。
2. 按照如下体系制备反应混合液：

反应组分	20 μL 反应体	终浓度
2×AugeGreen	10 μL	1×
F, R 引物	2 μL	各 0.1-0.5 μM
模板	适量	见注
10×ROX	适量	见附表 1
H ₂ O	Up to 20 μL	

注：模板浓度：DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。

因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。

cDNA 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。



3. 轻轻涡旋混匀反应混合液，转移固定体积至 PCR 管。

4. 运行 PCR 程序，PCR 程序设置。

反应程序设置

您可以根据扩增模板的性质和仪器的功能，选择以下三个程序之一进行实验。

A. 两步快速扩增法

这个程序适用于大多数引物 T_m 为 60°C 的扩增，熔解曲线遵循您所用仪器提供的标准流程执行。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 min	1
变性	95°C	5 s (见注 1)	45
退火&延伸	60°C	30 s	

注：1) 变性时间：如果扩增片段较短，变性时间可以低于 5 s，甚至可以低至 0 s。当变性时间设置为“0”时，它仅仅意味着温度增加到 96 °C，然后没有停留迅速降温。设置时间 5 s 可以确保 DNA 较长片段和高 GC 片段的变性。高性能的仪器会进一步增加扩增子变性的可靠性。

B. 三步扩增法

这个程序适用于扩增温度比退火温度高的实验。例如，如果扩增片段有相对较长的引物，容易产生非特异性的扩增，在更高的温度下进行延伸可以降低非特异性扩增。熔解曲线

设置遵循您所用仪器提供的标准流程执行。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 min	1
变性	95°C	5 s	45
退火	50-60°C	5 s (见注 2)	
延伸	72°C	25 s (见注 3)	

注：2) 退火温度：退火温度应根据引物 T_m 值设定，通常是 50 -60 °C 为佳。不过，引物 T_m 值（和扩增温度）应该设计尽可能地接近 60 °C（但仍在 50 – 60 °C 范围内），减少退火和变性温度之间的差距。这样温度增加所需时间更少，进而扩增效率更高。

3) 扩增温度：扩增温度设定在 72 °C 对于大多数扩增子通常效率更高。然而对于富含 AT 的扩增片段（> 70%）或含有 AT 富集补丁的扩增子，60 °C 延长通常可以获得更好的结果。

C. 通用程序

此程序适用于几乎所有 qPCR 仪器，也适用于使用快速扩增法无法达到较好效果的扩增子。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 s	45
退火&延伸	60°C	60 s	



AugeGreen 染料特性

1. 光谱特性

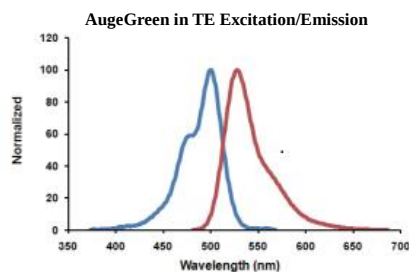


图 1. 在 TE 缓冲液中，结合到双链 DNA 中的 AugeGreen 染料的激发光谱（左图）和发射光谱（右图）。

2. 染料的稳定性

SYBR Green I 与 AugeGreen 荧

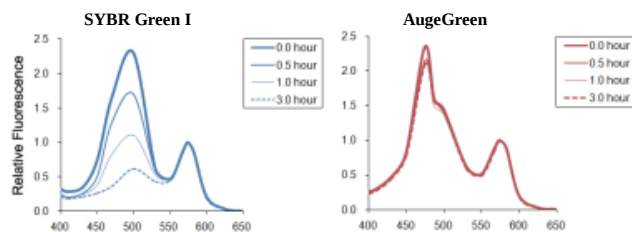


图 2. AugeGreen、SYBR Green I 的吸收光谱 1.2 μ M, pH 9 的 Tris 缓冲液中，99°C 孵育 3 h 后，两种荧光染料溶液的相对荧光强度，ROX 作参照物。

3. 染料的安全性

AugeGreen、SYBR Green I 荧光染料细胞膜渗透性比较

Ames 实验显示，AugeGreen 染料没有细胞毒性和致突变性，该染料不具细胞膜渗透性（图 3），这是其低细胞毒性的一个关键因素。相反地，众所周知，SYBR Green I 荧光染料具有很强的致突变性，可能原因是其抑制了细胞内 DNA 修复机制（Ohta, et al. Mutat. Res.492, 91(2001)），而 SYBR Green I 较强的细胞毒性是由其较高的细胞膜渗透性所导致的（图 3）。

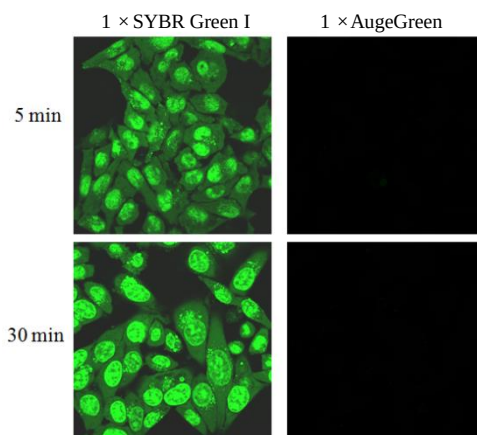


图 3. 37°C 条件下，分别用 SYBR Green I 和 AueGreen (1.2 μ M) 孵育 HeLa 细胞，分别在 5 min 或 30 min 后拍照，观察荧光强度。SYBR Green I 迅速渗透进入细胞，然而 AueGreen 几乎不具有细胞膜渗透性。

附表 1.不同 PCR 仪推荐 ROX 使用浓度

PCR Instrument	推荐 ROX 使用浓度	使用量 (20 μ L 体系)
BioRad: iCycler, MyiQ, MiQ 2, iQ 5, CFX-96, CFX-384, MJ Opticon, Option2, Chromo4, MiniOpticon Qiagen: Roto-Gene Q, Roto-Gene3000, Roto-Gene 6000 Eppendorf: Mastercycler realplex Illumina: Eco RealTime PCR System Cepheid: SmartCyler Roche: LightCycler 480, LightCycler 2.0	No ROX	None
ABI: 7500, 7500 Fast, ViiA 7 Stratagene: MX4000P, MX3000P, MX3005P	Low ROX 0.05~0.1 $\times$ (终浓度)	按 1:10 稀释 10 $\times$ ROX; 添加 1~2 μ L 稀释后的 1 $\times$ ROX 至最终反应体系
ABI: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOne plus	High ROX 1 $\times$ (终浓度)	添加 2 μ L 10 $\times$ ROX 至最终 反应体系

