

# 产品说明书

## AugeGreen™ Master Mix for HRM (2×)

产品货号: S2013S, S2013L

产品规格: 100T, 500T

产品内容:

组分	100T	500T
A. AugeGreen™ Master Mix for HRM (2×)	1 mL	5×1 mL
B. 10 × ROX reference dye	0.2 mL	1 mL

组分 A 包含 AugeGreen 染料, dNTP, PCR buffer (含 Tris 和 MgCl<sub>2</sub>), 热启动 Taq 聚合酶; 组分 B 是 10×ROX 参比染料。

## 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。收到本产品后, 请立即置于-20°C 储存。AugeGreen™ Master Mix for HRM (2×) 在-20°C 不会冷冻, 若发现产品冻上, 将产品置于室温融化, 并轻轻涡旋混匀。后续所有实验应在冰上操作。使用后, 该产品可以重新置于-20°C 储存。

## 产品介绍

AugeGreen™ Master Mix for HRM (2×) 是一款用于实时荧光定量 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 dsDNA 结合的“饱和染料”, 通过“按需求释放”的机制, 选择性的结合双链 DNA, 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, 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。

本产品附带 ROX Reference Dye 用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 方便客户针对不同型号荧光定量 PCR 仪时选择对应浓度使用。

本试剂盒可用于已知 SNP 分析, 未知突变基因扫描等。

## 注意事项

1. 本产品中含有荧光染料 AugeGreen, 保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
2. 如果试剂没有混匀, 其反应性能会有所下降。使用时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。
3. 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。
4. 20 $\mu$ L 反应体系中, 基因组 DNA 模板的使用量一般小于 100 ng, 并尽量保持不同反应之间有相同的模板量。模板纯度, OD<sub>260/280</sub> 1.6~2.0, OD<sub>260/230</sub> 1.5~2.0。

5. 建议对 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。
6. 由于 HRM 具有很高的灵敏性，因此在条件允许的情况下推荐使用 50  $\mu\text{L}$  反应体系，大的反应体系可以提高反应重复性，减少实验误差对熔解曲线的负面影响。
7. 引物设计：较短的 PCR 产物可以提高 HRM 的分辨率；因此在设计 PCR 引物时，遵循普遍的原则外，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。SNP 位点尽量处在 PCR 产物序列中间位置。较大的产物可以成功地进行分析，但通常分辨率较低。这是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。
8. 用于高分辨率熔解曲线分析（HRM）的 DNA 样本浓度应标准化。所有 DNA 样本都应进行定量，然后使用相同的稀释缓冲液调整至相同浓度，使所有样本的 Ct 值低于 30（21-25 较佳），且 Ct 值差异不超过 3。
9. 所有检测实验中都应包括一个无模板对照（NTC），检测潜在的污染。
10. 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。
11. 扩增时设定足量的 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。注意，PCR 产物量会影响 PCR 产物的熔融温度。

## 使用方法

### 建立扩增体系

1. 取出 AugeGreen™ Master Mix for HRM (2 $\times$ )，10  $\times$  ROX reference dye，引物，模板，RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，恢复至室温，充分混匀。
2. 按照如下体系制备反应混合液（建议置于冰上进行反应液的配制）：

反应组分	20 $\mu\text{L}$ 反应体系	50 $\mu\text{L}$ 反应体系	终浓度
AugeGreen™ Master Mix for HRM (2 $\times$ )	10 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	1 $\times$
正向引物 (10 $\mu\text{M}$ ) (见注 1)	1 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.25 $\mu\text{M}$
反向引物 (10 $\mu\text{M}$ ) (见注 1)	1 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	0.25 $\mu\text{M}$
模板 (见注 2)	-	-	-ng
10 $\times$ ROX reference dye (见注 3)	-	-	-
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu\text{L}$	Up to 50 $\mu\text{L}$	-

注：1) 引物终浓度为 0.3  $\mu\text{M}$  可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在 0.2~0.5  $\mu\text{M}$  范围内调整。

2) 由于 HRM 具有很高的灵敏性，因此须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) 常用体系为 20  $\mu\text{L}$ ，在条件允许的情况下推荐使用 50  $\mu\text{L}$  反应体系，大的反应体系可以提高反应重复性，减少实验误差对

熔解曲线的负面影响。

4) 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×(终浓度)	1×(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×(终浓度)	0.1×(例如: 按 1:10 稀释 10×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

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

建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。当出现模板浓度过低引起非特异扩增, 引物 T<sub>m</sub> 值较低导致的扩增效率低下或扩增曲线重现性不佳等现象时, 建议尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

#### A. 两步快速扩增法

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

#### B. 三步扩增法

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

注: 1) 先使用 60°C 30 sec 进行扩增, 如出现非特异性扩增, 可尝试在 60-66°C 范围内优化, 提高反应特异性。

2) 在熔解曲线分析时, 一般设置为 0.02~0.1°C 收集一次荧光。

3) 进行初次熔解曲线分析前, 需要确定每组 PCR 产物的 T<sub>m</sub> 值。进行熔解曲线分析时, 熔解曲线设置的温度范围应从 65°C 到 95°C, 涵盖前期确定的 T<sub>m</sub> 值整个范围。确定熔解温度 T<sub>m</sub> 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°C, 最高熔解温度比所有 PCR 产物的最低熔解温度低 5°C, 这样可以减少 HRM 分析所需的时间。