

SatGreen qPCR Master Mix for HRM (2×)

1 产品基本信息

产品名称: SatGreen qPCR Master Mix for HRM (2×)

产品编号: MF1844

2 规格或纯度

20 μL×100 T, 20 μL×500 T

组分	20 μL × 100 T	20 μL × 500 T
A. 2× SatGreen Master Mix for HRM	1 mL	5×1 mL
B. 10× ROX Reference Dye (ROX 参比染料)	0.2 mL	1 mL

注: 组分 A 包含 SatGreen 染料、dNTP (脱氧核苷三磷酸)、PCR buffer (含 Tris 和 MgCl₂)、热启动 Taq 聚合酶。

3 产品介绍

产品简介:

本产品是一款适用于实时荧光定量 PCR (qPCR) 和高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析的专业试剂。其核心成分 SatGreen 是专为 qPCR 和 HRM 分析设计的新型双链 DNA(dsDNA)“饱和染料”，通过“按需求释放”机制选择性结合双链 DNA，能极大降低对 PCR 扩增的抑制作用，使双链 PCR 产物结合量达到饱和，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的差异。

产品用途广泛，可用于已知单核苷酸多态性 (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，方便用户根据不同型号荧光定量 PCR 仪选择对应浓度使用。

产品特点:

- 高灵敏度：可精准探测 DNA 序列的细微差异，能识别单碱基变化，适配 HRM 分析对分辨率的高要求。
- 低 PCR 抑制：对 PCR 扩增反应的抑制作用小，抑制效果远小于 SYBR Green I，保障扩增效率。
- 高安全性：几乎不可穿透完整的细胞膜，无致突变性，生物安全性优于 SYBR Green I。
- 兼容性好：与 SYBR Green I 光谱相似，可直接替代使用，无需更换仪器或更改实验步骤，降低方法迁移成本。

适用范围:

- 实时荧光定量 PCR 实验
- 高分辨率熔解曲线 (HRM) 分析

产品参数:

- 结合 DNA 时：吸收波长 (λ_{abs}) / 发射波长 (λ_{em}) = 500 / 530 nm
- 未结合 DNA 时：吸收波长 (λ_{abs}) = 471 nm

4 储存与运输

储存条件：-20°C避光保存，避免强光照射

运输条件：冰袋运输

5 使用方法（仅供参考）

在 PCR 管中制备反应液(置于冰上进行配制)。

反应组分	20 μL 反应体系用量	终浓度
2× SatGreen Master Mix for HRM	10 μL	1×
正向引物 (10 μM) (见注 1)	1 μL	0.25 μM
反向引物 (10 μM) (见注 1)	1 μL	0.25 μM
模板 (见注 2)	-	-ng
10× ROX Reference Dye (见注 3)	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	up to 20 μL	-

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:

仪器型号	推荐 ROX 使用浓度	终浓度
ABI 7900 HT	High ROX 1× (终浓度)	1× (示例: 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× (示例: 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

设置反应程序, 将反应液放入仪器, 运行程序扩增。

● 两步法

程序阶段	温度	时间	循环次数	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	35	是
熔解曲线分析 (见注 2)				

● 三步法

程序阶段	温度	时间	循环次数	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	35	否
延伸	72°C	30 sec	35	是
熔解曲线分析 (见注 2)				

注:

- (1) 两步法适用于大多数引物 Tm 为 60 °C 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°C 收集一次荧光。
- (4) 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。
- (5) 进行初次熔解曲线分析前，需确定每组 PCR 产物的 Tm 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 Tm 值整个范围。确定熔解温度 Tm 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。

6 常见问题

Q1：基因组 DNA 模板量和纯度有什么要求？

答：在 20 μL 反应体系中，基因组 DNA 模板量一般需小于 100 ng；模板纯度需满足 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.6~2.0 之间，OD₂₆₀/OD₂₃₀ 在 1.5~2.0 之间。

Q2：进行 HRM 分析时，对样品的基因组 DNA 纯化方法有什么建议？

答：建议对所有用于 HRM 分析的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。

Q3：可以用 50 μL 体系吗？

答：可以。HRM 具有很高的灵敏性，在条件允许的情况下可使用 50 μL 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。

Q4：HRM 分析中，引物设计有哪些要点？

答：核心要点是“短产物 + SNP 位点居中”：

- 产物长度：较短的 PCR 产物可提高 HRM 分辨率，设计时尽量使产物长度在 80~300 bp 之间；若用于 SNP 分析，建议产物长度为 80~120 bp，单个碱基变化对短产物熔解行为的影响更显著，分辨率更高。
- SNP 位点位置：SNP 位点需尽量处在 PCR 产物序列的中间位置，避免位点靠近两端导致熔解信号差异不明显，影响分型准确性。
- 非特异性控制：若引物较长易引发非特异性扩增，可通过提高延伸温度减少非特异性产物，避免其干扰 HRM 分析。

Q5：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。

Q6：单核苷酸多态性（SNP）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 注意事项

- 本产品含荧光染料，荧光染料对光敏感，保存产品或配制 PCR 反应液时需严格避免强光照射，防止染料降解影响信号强度。
- 本产品在 -20°C 不会冷冻，若运输或储存过程中意外冻上，需置于室温自然融化，融化后轻轻涡旋混匀，禁止剧烈振荡（避免酶活性降低），后续所有实验步骤需在冰上操作，防止试剂变质。

- 配制反应体系时，需轻轻颠倒混匀各组分，禁止使用振荡器，尽量避免产生泡沫；泡沫会导致 PCR 管内体积不均、荧光信号采集异常，混匀后需瞬时离心，使管壁残留液体集中到管底。
- 引物纯度直接影响反应特异性，低纯度引物易产生非特异性扩增产物，干扰 HRM 分析，建议使用 PAGE 级别及以上纯化的引物，使用前需通过电泳或分光光度计验证纯度。
- 本产品仅限于科研用途，不得用于临床诊断、食品检测等非科研领域，且不得存放于普通住宅内，需存放在实验室专用试剂储存区（避光、-20°C 条件）。
- 为保障实验人员安全与健康，操作过程中需遵循所在实验室的常规安全规范，如佩戴一次性手套、护目镜，避免试剂接触皮肤与黏膜；若不慎接触，需立即用大量清水冲洗，必要时就医。