

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 μ L 反应体系用量	终浓度
2 \times SatGreen Master Mix for HRM	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 μ M 间调整, 通常为 0.3 μ M;
- (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 \times (终浓度)	1 \times (示例: 2 μ L ROX/20 μ L 体系, 5 μ L ROX/50 μ L 体系)
ABI 7500 Fast	Low ROX 0.05~0.1 \times (终浓度)	0.1 \times (示例: 按 1:10 稀释 10 \times ROX; 2 μ L ROX/20 μ L 体系, 5 μ L ROX/50 μ L 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 $^{\circ}$ C	120 sec	1	否
变性	95 $^{\circ}$ C	10 sec	35	否
退火 & 延伸	60 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C	120 sec	1	否
变性	95 $^{\circ}$ C	10 sec	35	否
退火	60 $^{\circ}$ C	15 sec	35	否
延伸	72 $^{\circ}$ 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 T_m 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 $0.02\sim 0.1^{\circ}\text{C}$ 收集一次荧光。
- (4) 先使用 $60^{\circ}\text{C} 30\text{ sec}$ 进行扩增, 如出现非特异性扩增, 可尝试在 $60\sim 66^{\circ}\text{C}$ 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 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°C 到 95°C , 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°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 $20\ \mu\text{L}$ 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 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 $1.6\sim 2.0$ 之间, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 在 $1.5\sim 2.0$ 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 $50\ \mu\text{L}$ 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 $50\ \mu\text{L}$ 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。

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 $80\sim 300\text{ bp}$ 之间; 若用于 SNP 分析, 建议产物长度为 $80\sim 120\text{ bp}$, 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℃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。