

浓缩国际权威精华，
铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务：

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品

HRM Analysis Kit (EvaGreen)

HRM分析试剂盒 (EvaGreen)

目录号: FP210

产品内容

试剂盒组成	FP210-01 20 µl×125 rxn	FP210-02 20 µl×500 rxn
2x HRM Analysis PreMix (with EvaGreen)	1.25 ml	4×1.25 ml
50×ROX Reference Dye	250 µl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2×1 ml	5×1 ml

储存条件

收到本产品后，请立即置于-20 °C 避光保存。从-20 °C 取出使用时，将冻存的2x HRM Analysis PreMix和50×ROX Reference Dye溶解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻(在解冻过程中盐会出现分层现象，未混匀进行冷冻，盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用，可在2~8 °C条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

本产品结合了饱和染料EvaGreen和抗体酶的优点，是一款适用于高分辨率溶解曲线（High Resolution Melting, HRM）分析的专业试剂盒。本品是一种2× PreMix，PCR反应液配制十分简单方便；具有分辨率高和模板高度适应性等特点。

与SYBR Green不同，EvaGreen在高浓度情况下不会抑制PCR反应；可以使双链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。

本产品可用于已知SNP分析，以及未知突变基因扫描和甲基化PCR分析等研究。

试剂盒特点

1. HRM Analysis PreMix采用了抗体修饰的热启动DNA聚合酶，配合精心优化Buffer体系，具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。
2. HRM Mix中预混有Eva Green饱和染料，其在饱和状态下具很高的熔解曲线分辨率，可以区分单个碱基的变异。
3. 该产品独特的Buffer体系进一步增加了熔解曲线的稳定性，提高扩增的特异性。
4. 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。

试剂盒原理

SYBR Green是目前被广泛应用于荧光定量PCR分析的荧光染料，但由于对PCR的抑制较严重，会被控制在较低的使用浓度，SYBR Green与双链DNA的结合处于非饱和状态，所以称为“非饱和染料”。SYBR Green的这种性质会导致在“染料重排”现象的发生，从而影响熔解曲线的分辨率，所以不能够通过熔解曲线区分扩增产物之间单个碱基之间的差异。

EvaGreen 是一种同时适用于荧光定量 PCR 和HRM 分析的新一代染料。这种染料通过一种被称为“按要求释放”的全新机制，选择性的结合双链 DNA。这一机制保证了较低的PCR 抑制作用，同时也允许在染料饱和和浓度下进行分辨单碱基差异的HRM分析。

注意事项

1. 本产品中含有荧光染料EvaGreen，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 μ 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，OD260/280 1.6~2.0，OD260/230 1.5~2.0。
5. 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 μ 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。
6. 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80~120之间。SNP位点尽量处在PCR产物序列中间位置。

实验结果:

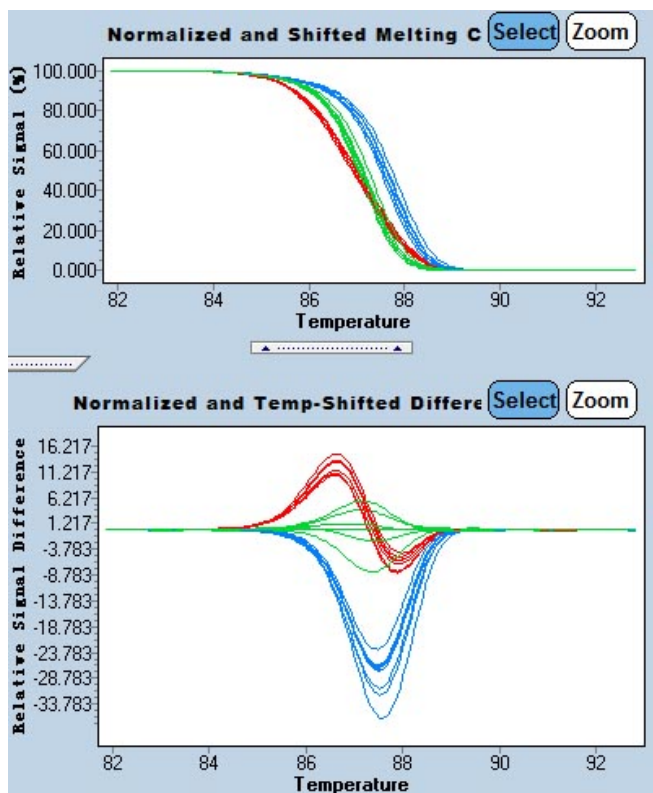


图1. 对已知SNP进行检测, NCBI Assay ID为ss869699; PCR产物长度为108 bp; 24个检测样本。Roche LightCycler 480仪器运行,收集熔解曲线信号参数: Ramp Rate 0.05; Acquisitions 12; Gene scanning方法分析。结果中可以看出, HRM Analysis Kit的不同基因型分辨明确, 相同基因型熔解曲线重复性高, 不存在误判。

操作方法

<1> 建立HRM PCR反应体系:

请注意将2x HRM Analysis PreMix和50x ROX Reference Dye避光保存。

1. 溶解2x HRM Analysis PreMix (如果保存在-20°C), 50x ROX Reference Dye, 模板, 引物和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行HRM PCR反应液的配制。

反应体系

组成成分	50 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2x HRM Analysis PreMix	25 μl	10 μl	1x
正向引物 (10 μM)	1.5 μl	0.6 μl	0.3 μM*
反向引物 (10 μM)	1.5 μl	0.6 μl	0.3 μM*
模板**	-	-	-ng
50x ROX Reference Dye△	-	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μl	至25 μl	-

§ 常用体系为20 ul, 在条件允许的情况下可50 ul反应体系, 大的反应体系可以减少实验误差对熔解曲线的负面影响。

*引物终浓度为0.3 μM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 μM范围内调整。

**由于HRM反应较灵敏, 须尽量保持不同样本之间有相同的模板量;

△ 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI 7900HT	5x (例如: 5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500 Fast	1x (例如: 1 μl ROX/50 μl体系)
Roche LightCycler 480, Qiagen Roter-Gene	无需添加

<2> 进行PCR反应

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_m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。

两步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	10 sec	变性	否
		60°C Δ1	30 sec	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) Δ2					

三步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	10 sec	变性	否
		60°C	20 sec	退火	否
		72°C	30 sec	延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) Δ2					

Δ1 请先使用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。

Δ2 HRM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. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中, 开始反应。

实验案例

根据NCBI SNP数据库, 选取已知的SNP进行检测, 检测的SNP信息如下:

RefSNP number: rs174538

Gene Name: FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1)

序列: CGCTCCGCCACCGGAAGAACACGTCG[A/G]CAGGAGCAGGCGCCTAGCACAAACCG

Allele Frequency: A=0.314, G=0.686

根据该SNP位点两侧序列信息, 设计引物: FEN1_F: CCTCAACGCTCTCACCATTTTG;

FEN1_R: GGCACCTCCTTTTCCGGTTGTG; 扩增PCR产物长度为108 bp。

配置反应体系, 在Roche LightCycle480 仪器上运行, 检测24个个体。

反应体系:

组成成分	20 μl 体系
2x HRM Analysis PreMix	10 μl
正向引物 (10 μM)	0.6 μl
反向引物 (10 μM)	0.6 μl
模板	1 ul (~50 ng)
50× ROX Reference Dye*	0 μl
RNase-Free ddH ₂ O	至20 μl

*LightCycle 480 仪器不需要ROX参比染料

反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	10 sec	变性	否
		60°C	30 sec	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					