

版本号: FP150416

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 μ l \times 125 rxn | FP210-02 20 μ l \times 500 rxn |
|---|---|---|
| 2 \times HRM Analysis PreMix (with EvaGreen) | 1.25 ml | 4 \times 1.25 ml |
| 50 \times ROX Reference Dye | 250 μ l | 1 ml |
| RNase-Free ddH ₂ O | 2 \times 1 ml | 5 \times 1 ml |

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C 避光保存。从-20 $^{\circ}$ C 取出使用时, 将冻存的2 \times HRM Analysis PreMix和50 \times ROX Reference Dye室温融化, 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 $^{\circ}$ 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熔解曲线(High Resolution Melting, HRM)分析的专业试剂盒。本品是一种2 \times 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EvaGreen饱和染料，其在饱和状态下具有很高的熔解曲线分辨率，可以区分单个碱基的差异。
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，保存本产品和配制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，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。模板纯度要求：OD_{260/280}：1.6-2.0，OD_{260/230}：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 bp 之间。SNP 位点尽量处在 PCR 产物序列中间位置。

操作方法

<1> 建立HRM PCR反应体系:

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

1. 融化2×HRM Analysis PreMix (如果保存在-20°C), 50×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 |
|-------------------------------|----------|----------|---------|
| 2×HRM Analysis PreMix | 25 µl | 10 µl | 1× |
| 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 |
| 50×ROX Reference Dye Δ | — | — | — |
| RNase-Free ddH ₂ O | 至 50 µl | 至 20 µl | — |

[§]常用体系为20 µl, 在条件允许的情况下可50 µl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;

Δ 几种常见仪器的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表:

| 仪器 | 终浓度 |
|--|----------------------------|
| ABI 7900HT | 5× (例如: 5 µl ROX/50 µl 体系) |
| ABI 7500Fast | 1× (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 μ l 体系 |
|--------------------------------|--------------------|
| 2 \times HRM Analysis PreMix | 10 μ l |
| 正向引物 (10 μ M) | 0.6 μ l |
| 反向引物 (10 μ M) | 0.6 μ l |
| 模板 | 1 μ l (~50 ng) |
| 50 \times ROX Reference Dye* | 0 μ l |
| RNase-Free ddH ₂ O | 至 20 μ l |

*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 \times | 95 $^{\circ}$ C | 2 min | 预变性 | 否 |
| PCR 反应 | 40 \times | 95 $^{\circ}$ C | 10 sec | 变性 | 否 |
| | | 60 $^{\circ}$ C | 30 sec | 退火/延伸 | 是 |
| 熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) | | | | | |

实验结果:

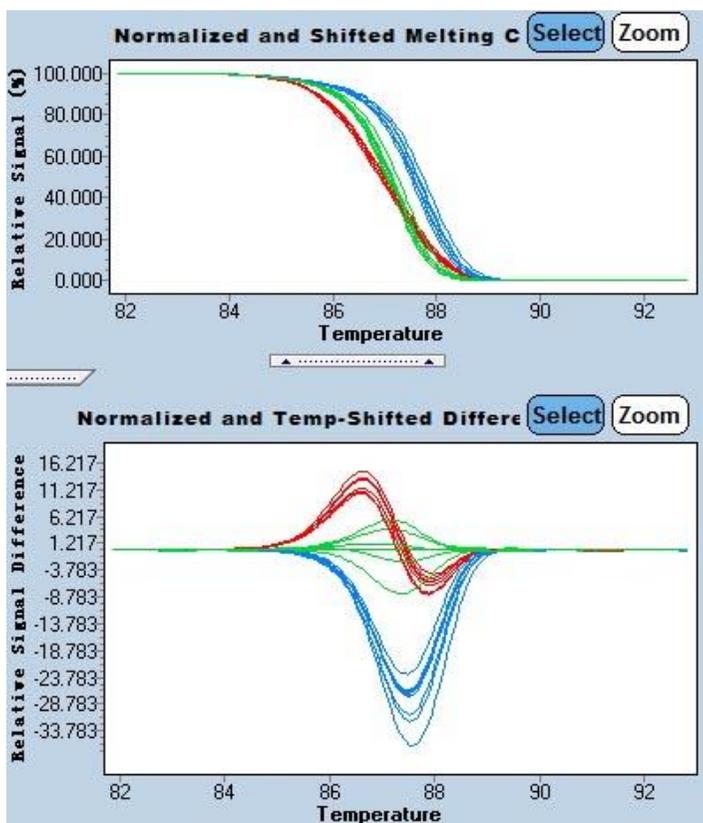


图 1. 对已知 SNP 进行检测, NCBI Assay ID 为 ss869699; PCR 产物长度为 108 bp; 检测 24 个样本。Roche LightCycler 480 仪器运行, 收集熔解曲线信号参数: Ramp Rate 0.05; Acquisitions 12; Gene scanning 方法分析。结果中可以看出, HRM Analysis Kit 对不同基因型分辨明确, 相同基因型熔解曲线重复性高, 不存在误判。

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