

# M5 Hiper HRM 分析试剂盒 (EvaGreen) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper HRM 分析试剂盒 (EvaGreen)	1ml	MF1317-01
M5 Hiper HRM 分析试剂盒 (EvaGreen)	5x1ml	MF1317-05

**【储存条件】** -20°C, 避光保存, 有效期 24 个月。

## 【产品简介】

M5 Hiper HRM 分析试剂盒 (EvaGreen) 是一款适用于高分辨率熔解曲线 (High Resolution Melting, HRM) 分析的预混体系, 浓度为 2×, 包含 Eva Green 染料、Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、Mg<sup>2+</sup> 以及增强剂等成分。本品包含的 Eva Green 是一种饱和染料, 能够饱和的结合于双链 DNA 所有小沟位置, 有效区分扩增产物之间单个碱基的差异。高浓度的 Eva Green 也消除了“染料重排”现象, 使得该产品也可以用于多重 PCR 检测。本产品包含的 Taq DNA Polymerase 是一种经基因工程改造的重组酶, Taq DNA Polymerase 经过新型抗体修饰, 独特的 PCR 缓冲体系与抗体酶组合, 有效抑制非特异的产生, 搭配 Eva Green 饱和染料, 荧光信号更强, 灵敏度更高。本产品能够进行高特异性扩增, 对单碱基突变进行快速、准确的分析, 适用于基因突变和 SNP 分型等检测。

## 【产品组份】

	MF1317-01	MF1317-05
M5 Hiper HRM 分析 mix (EvaGreen)	1ml	5x1ml
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	1ml	5x1ml

## 【注意事项】

- 1、本产品含有荧光染料 Eva Green, 保存本产品或配置 PCR 反应体系时应避免强光照射。
- 2、使用前请在本品完全融化后上下颠倒轻轻混匀, 并经短暂离心后使用。
- 3、避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降, 建议分装保存。
- 4、推荐使用 Roche LightCycler 480、Roche LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪; 如使用 ABI Prism7500/7500 Fast、ABI Prism 7900 等仪器需要搭配 ROX Reference Dye I, 如需 ROX ReferenceDye I 可联系当地业务员。

## 【操作实例】

以下举例为常规 PCR 反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和扩增效果不同进行相应的改进和优化。

- 1、将 2×M5 Hiper HRM 分析 mix、引物、模板和 RNase-Free Water 置于冰上融化备用, 混匀并短暂离心后配置下列反应体系。

### 2、配制 PCR 体系

	20μL 体系	50μL 体系
2×M5 Hiper HRM 分析 mix	10μL	25μL
Forward Primer, 10μM	0.6μL	1.5μL
Reverse Primer, 10μM	0.6μL	1.5μL
Template DNA(2)	XμL	XμL
ROX Reference Dye I(3)	—	—
RNase-Free Water	Up to 20μL	Up to 50μL

### 注意事项:

- 1) 通常引物浓度以 0.3μM 可以得到较好结果, 可以在 0.1-1.0μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。

2) 通常 DNA 模板的量以 1-100ng 基因组 DNA 为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。

3) ROX 染料用于校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 不同仪器的激发光学系统有所不同, 因此 ROX 染料的使用量必须与相应的荧光定量 PCR 仪相匹配。几种常见仪器的最适 ROX Reference Dye I 使用量见下表:

仪器类型	ROX 使用量
Roche LightCycler 480、RocheLightCycler 96、Qiagen Roter-Gene	不需 ROX 染料校正
ABI Prism 7500/7500Fast	1μL/50μL 体系, 0.4μL/20μL 体系
ABI Prism 7900	5μL/50μL 体系, 2μL/20μL 体系

3、混匀, 短暂离心, 将溶液收集到管底。

#### 4、PCR 反应程序

##### A、两步法反应程序:

步骤	荧光信号采集	温度	时间	循环
预变性	否	95°C	30s-5min <sup>1)</sup>	1
变性	否	95°C	10s	} 40-45 <sup>3)</sup>
退火/延伸	是	60°C <sup>2)</sup>	30s	
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Cure Stage) <sup>4)</sup>				

##### B、三步法反应程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	30s-5min	1
变性	95°C	10s	} 40-45
退火	60°C	30s	
延伸	72°C	30s	
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Cure Stage)			

#### 注意事项:

1) 本产品 95°C 预变性 30s 即可使酶激活, 在此条件下, 大多数模板可良好的进行解链。对 GC 含量高、二级结构复杂的模板, 可将预变性适当时间延长至 5min, 以使起始模板充分解链, 可根据模板情况确定最佳的预变性时间。

2) 建议采用两步法 PCR 反应程序, 退火温度请以 60°C-64°C 作为设定范围的参考, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 提高退火温度, 由此优化反应条件。若因使用 Tm 值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法 PCR 扩增, 退火温度请以 56°C-64°C 的范围作为设定参考。

3) 大多数模板可以在 40 个循环得到很好的扩增曲线, 对于低拷贝模板可增加至 45 个循环内。可根据实验确定最佳的循环数, 以得到更好的扩增曲线。4) 熔解曲线分析时, 一般设置 0.02-0.1°C 收集一次荧光。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。