

版本号: FP210831

# 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 $\mu$ l $\times$ 125 rxn	FP210-02 20 $\mu$ l $\times$ 500 rxn
2x HRM Analysis PreMix (with EvaGreen)	1.25 ml	4 $\times$ 1.25 ml
50 $\times$ ROX Reference Dye	250 $\mu$ l	1 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	2 $\times$ 1 ml	5 $\times$ 1 ml

### 储存条件

本产品于 -30~-15 $^{\circ}$ C可保存12个月。收到本产品后，请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C 避光保存。从-30~-15 $^{\circ}$ C 取出使用时，将冻存的2x HRM Analysis PreMix和50 $\times$ 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 $^{\circ}$ 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溶解曲线 (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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

## 操作方法

<1> 建立HRM PCR反应体系:

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

1. 溶解2x HRM Analysis PreMix (如果保存在-15~-30℃), 50×ROX Reference Dye, 模板, 引物和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 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	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△	—	—	—
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	至50 μl	至20 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溶解曲线的负面影响。

\*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;

△ 几种常见仪器的匹配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 7500 Fast	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<sub>m</sub>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△1	30 sec	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) △2					

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) △2					

△1 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。

△2 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: CGCTCCGCCACCGGAAGAACACGTGC[AVG]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 $\mu$ l 体系
2x HRM Analysis PreMix	10 $\mu$ l
正向引物 (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ l
反向引物 (10 $\mu$ M)	0.6 $\mu$ l
模板	1 $\mu$ l (~50 ng)
50 $\times$ ROX Reference Dye*	0 $\mu$ l
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	至20 $\mu$ 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：

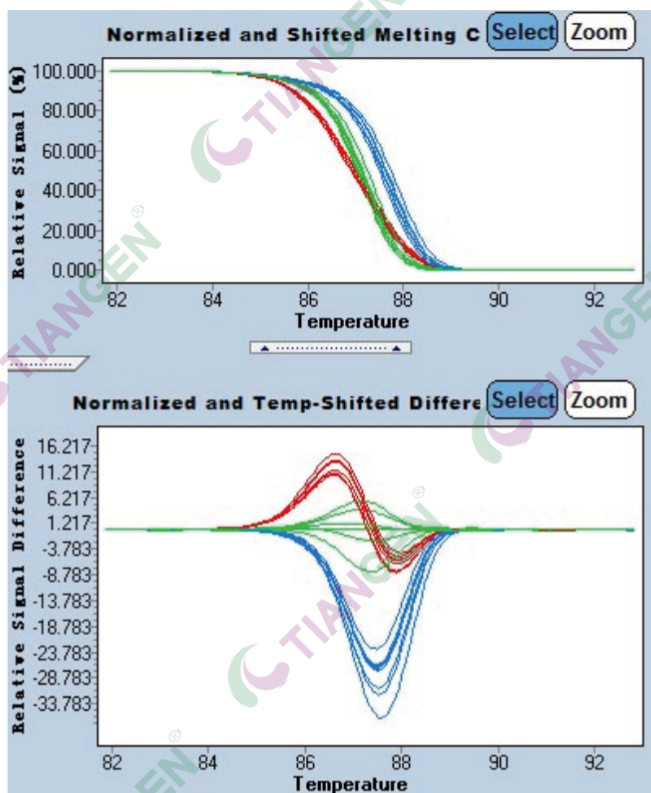


图1. 对已知SNP进行检测，NCBI Assay ID为ss869699；PCR产物长度为108 bp；24个检测样本。Roche LightCycler 480仪器运行,收集熔解曲线信号参数：Ramp Rate 0.05；Acquisitions 12；Gene scanning方法分析。结果中可以看出，HRM Analysis Kit的不同基因型分辨明确，相同基因型熔解曲线重复性高，不存在误判。





TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

# 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