

SatGreen qPCR Master Mix for HRM(2×)

2×预混 Mix，按需求释放机制，安全稳定，专用 qPCR/HRM 分析

产品货号：M10201

产品规格：20 μL×100 T，20 μL×500 T

储运条件：-20 °C避光保存，冰袋运输。

产品简介：

SatGreen qPCR Master Mix for HRM是一款适用于实时荧光定量PCR（qPCR）与高分辨率熔解曲线（HRM）分析的2×预混试剂，专为高分辨率熔解曲线(HRM)分析设计的荧光定量PCR专用试剂盒，核心功能组分为优化配比的2× SatGreen Master Mix for HRM，可实现qPCR扩增与HRM分析的“一步式”衔接。其核心成分SatGreen是基于“按需求释放”机制设计的新型dsDNA饱和染料，核心原理精准适配HRM技术需求：该染料能与DNA双链紧密结合且无序列偏好性，相比传统SYBR Green I类染料，本产品能在极低抑制PCR扩增的前提下，实现双链DNA的饱和结合，避免染料重排问题。本试剂盒中还搭配ROX Reference Dye，可校正孔间荧光误差，方便客户根据不同型号荧光定量PCR仪，选择对应浓度使用。相较于传统非饱和荧光染料试剂盒，本产品有效解决了传统染料抑制性强、HRM分辨率不足的缺点，荧光信号更强、背景噪音更低，能清晰区分单碱基差异带来的熔解曲线变化；广泛适配已知SNP分析、未知突变基因扫描、基因SNP分型、病原体耐药突变检测、肿瘤相关基因突变筛查、基因甲基化状态分析等HRM应用场景，是高精度核酸分析的专业工具。

在分子诊断、遗传研究及临床科研领域，HRM技术因快速、灵敏、无需探针设计的优势被广泛应用，而荧光染料性能与酶促反应效率是决定HRM结果准确性的核心因素。本试剂盒通过饱和染料优化设计，从既具备高灵敏度、低抑制性的技术优势，又兼顾高安全性与操作便捷性，为多场景研究提供可靠支撑：在临床诊断中，可快速筛查肿瘤患者EGFR、KRAS等基因的热点突变；在遗传疾病研究中，能高效完成地中海贫血、耳聋等单基因遗传病的基因分型。本试剂盒降低了精准分子检测的技术门槛，为基因多态性分析、突变检测等分子生物学研究提供了稳定的技术支撑，推动临床诊断升级、遗传机制研究及病原体监测等领域的快速发展。

注：效能等同Biotium EVAGREEN®DYE-BASED QPCR MASTER MIXES；

注：本文中 EVAGREEN®为 Biotium 的商标及注册商标。

应用范围：实时荧光定量 PCR，高分辨率熔解曲线分析，SNP 分析，未知突变基因扫描等基因多态性与突变检测类研究等

产品特点：

- **高灵敏度：**精准探测 DNA 序列细微差异，能识别单碱基变化，适合 HRM 分析；
- **稳定性优异：**对 PCR 扩增抑制性极低，支持快速 PCR 流程高效进行；
- **高安全性：**几乎不可穿透完整的细胞膜，无致突变性，比 SYBR Green I 更安全；
- **按需求释放：**随扩增进程精准供能，支撑高浓度饱和结合；
- **方便快捷：**2×预混液，用于快速循环实验；
- **兼容性好：**与 SYBR Green I 光谱相似，可直接替代无需更换仪器和更改步骤；

产品参数：

- Ex/Em: 500/530 nm (结合 DNA)；

产品组分：

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	0.2 mL	1 mL
C. RNase-Free Water	1×1.7 mL	3×1.7 mL

注：100 T 按照 20 μ L 反应体系计算；

注：组分 A 包含 SatGreen 染料，dNTP，PCR buffer（含 Tris 和 $MgCl_2$ ），热启动 Taq 聚合酶。

注意事项：

- 本产品中含有荧光染料，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
- 2× SatGreen Master Mix for HRM在-20 °C不会冷冻，若发现冻上，将其置于室温融化，并轻轻涡旋混匀，后续所有实验应在冰上操作。
- 使用前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。
- 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。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：

一、实验前准备

1. 试剂准备：

- 将试剂盒中的组分A（2× SatGreen Master Mix for HRM）、组分B（10× ROX Reference Dye）组分C（RNase-Free Water）从储存条件（如-20 °C）取出，放置于冰上或冰板上。

2. 仪器准备：

- PCR仪。

3. cDNA 准备：

- 准备高质量的cDNA。

二、操作步骤

1. 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	终浓度
2× SatGreen Master Mix for HRM	10 μ L	1×
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× ROX Reference Dye（见注 3）	-	-
RNase-Free Water	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) 建几种常见仪器的匹配ROX Reference Dye浓度见下表：

仪器	推荐 ROX 使用浓度	终浓度
----	-------------	-----



ABI 7900 HT	High ROX 1× (终浓度)	1× (例如: 2 μL ROX/20 μL 体系, 5 μL ROX/50 μL 体系)
ABI 7500 Fast	Low ROX 0.05~0.1× (终浓度)	0.1× (例如: 按 1:10 稀释 10× ROX; 2 μL ROX/20 μL 体系, 5 μL ROX/50 μL 体系)
Roche LightCycler96/ Roche LightCycler 480/Qiagen Roter Gene	No ROX	无需添加

2. 设置反应程序, 将反应液放入仪器, 运行程序扩增。

A. 两步法

程序	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95 °C	120 sec	1	否
变性	95 °C	10 sec	35	否
退火&延伸	60 °C	30 sec（见注 1）		是
熔解曲线分析（见注 2）				

B. 三步法

程序	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95 °C	120 sec	1	否
变性	95 °C	10 sec	35	否
退火	60 °C	15 sec		否
延伸	72 °C	30 sec		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 0.02~0.1 °C 收集一次荧光。
- (4) 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。
- (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。

三、结果判读



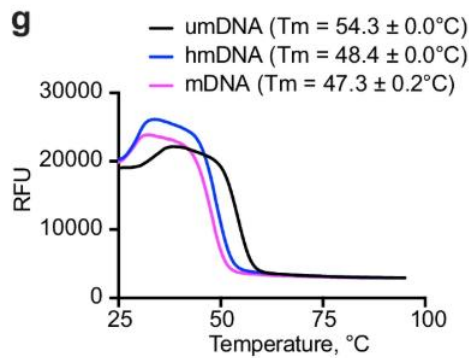


图 1.高分辨率溶解曲线

结果判读： umDNA、hmDNA 和 mDNA 的高分辨率溶解曲线，结果表明 hmDNA 和 mDNA 的 T_m 值显著低于 umDNA。

图片引自文献《Mechanism for the substrate recognition by a eukaryotic DNA N6-adenine methyltransferase complex》

(DOI: 10.1038/s41467-025-63738-y)

常见疑问与解答：

- 问：基因组DNA模板量和纯度有什么要求？

答：在 20 μ L 反应体系中，基因组 DNA 模板量一般小于 100 ng。模板纯度要求为 OD_{260}/OD_{280} 在 1.6-2.0 之间， OD_{260}/OD_{230} 在 1.5-2.0 之间。

- 问：进行HRM分析时，对样品的基因组DNA纯化方法有什么建议？

答：尽可能对 HRM 分析的所有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。

- 问：可以用50 μ L体系吗？

答：HRM 具有很高的灵敏性，在条件允许的情况下可使用 50 μ L 反应体系，大的反应体系可提高反应重复性，减少实验误差对溶解曲线的负面影响。

- 问：HRM分析中，引物设计有哪些要点？

答：较短的 PCR 产物可提高 HRM 的分辨率。设计 PCR 引物时，尽量保持产物长度在 80-300 之间。对于单核苷酸多态性 (SNP) 分析，建议使用 80-120 个碱基对的 PCR 产物，且 SNP 位点尽量处在 PCR 产物序列中间位置。虽然较大的产物也能分析，但通常分辨率较低，因为单个碱基的变化对 100 个碱基对的 PCR 产物的熔解行为的影响比对 350 个碱基对的 PCR 产物的影响更大。

- 问：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。

- 问：单核苷酸多态性基因分型实验，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。

- 问：扩增时对PCR循环次数有什么要求？

答：扩增时要设定足量的 PCR 循环次数，使所有样本都达到 PCR 的平台期，以确保产生足量的扩增产物用于 HRM 分析。因为 PCR 产物量会影响 PCR 产物的熔融温度。

- 问：M10201 与 M10302，在应用上有什么区别。

答：M10201：需要HRM分析（基因突变检测 (SNPs、插入缺失)、基因分型（如等位基因区分）、甲基化分析、非特异性扩增鉴别）、高灵敏度、高精度定量需求（如稀有mRNA表达、微量病原体）。

M10302：常规 qPCR 定量，无需高分辨率溶解曲线 (HRM) 分析。

