

Bestar[®] HRM Mastermix

产品名称	Bestar [®] HRM Mastermix
DBI-2231	200Reaction (50ul)
DBI-2232	1000Reaction(50ul)

●储存条件

-20°C长期保存。反复冻融不影响使用效果；如果频繁使用，建议储存于4°C。

●产品简介

- **DBI[®] Bioscience** Bestar[®] HRM Mastermix 试剂盒是经过长期研究，反复实验，成功制造出的用于HRM实验的试剂盒。该试剂盒包括了HRM-PCR测试分析所需要的全部试剂。
- 高效率熔解曲线（HRM）是一种用于筛查靶基因突变，分析鉴定变异样本的试验方法，使用本试剂盒能准确，快速，简便的完成HRM实验，得出精确、稳定的实验数据。
- 本试剂盒产品反应Buffer 经过优化改良，可以抑制非特异性反应，能够得到精确的实验结果。

●产品主要成份 (50ul反应*200次量)

名称	数量
Bestar [®] HRM Mastermix	1ml×5支
50×ROX Reference Dye	200ul×1支

备注：50×ROX Reference Dye 用于校正加样孔之间的体积误差和荧光信号误差，使用于以下荧光定量仪器，使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 /Step One [™] / Step One Plus [™] Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为1×
ABI 7500、7500 Fast Real-Time PCR System 和 Agilent Technologies 公司的 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为0.1×

说明：1: qPCR实验时，在配置反应孔mix之前，每1ml Mix中加入40ul 50×ROX(qPCR实验仪器型号决定加入体积) 或者50×ROX 4ul,用1ml移液器轻轻混匀。

2: 不用Reference Dye 校正的qPCR扩增仪器，使用时无需添加ROX。

● 试剂盒特点

Bestar[®] HRM Master Mix 4大特点

- ❖ 使用了Bestar[®] Taq DNA Polymerase热启动酶，能极大程度降低非特异性背景产生。
- ❖ 采用新型荧光染料，非常具有稳定性，能够适应各种qPCR反应条件。
- ❖ 对qPCR反应无抑制，qPCR效率高。
- ❖ 荧光本底非常低，能够得到更精确的实验数据。

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请认真阅读：

- ❖ 冻结产品融解后，请上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻微离心后使用。
- ❖ 融解后的试剂请于冰上放置。
- ❖ 本产品中不含有实验使用的引物。
- ❖ 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube等，尽量避免污染。

● HRM 实验操作顺序

1. 溶解试剂，上下颠倒混匀，确认反应溶液完全溶解。（避免使用振荡器混匀，剧烈振荡会降低制品性能）。
2. 配制HRM qPCR反应用混合液，分装至qPCR反应管中。
3. 添加qPCR扩增用模板。
4. 使用Real Time PCR扩增仪，进行qPCR扩增反应和HRM融解曲线分析实验。
5. 反应液配制方法和qPCR扩增条件请参照使用方法。
6. Real Time PCR仪的使用方法，请参照各种仪器说明书。
7. 本产品采用了经过化学修饰型Bestar[®] Taq DNA Polymerase，请按照推荐的实验方法进行Hot Start法PCR扩增。

重要提示:

本产品中使用经过化学修饰Bestar[®] Taq DNA Polymerase, 与其他公司的抗体型Hot Start用DNA聚合酶相比, 90℃以下避免了副反应的产生, 需要PCR反应前的95℃ 2分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间太长, 会使酶的活性下降, 其PCR的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在PCR反应前进行模板的预变性, 推荐设定为95℃ 2分钟。

● 操作方法

- ◆ 用ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300 System的操作方法请按照Applied Biosystems公司的仪器使用说明书要求进行实验操作(其它类型的荧光定量PCR仪器请按照说明书操作)。

1) 按下列组份配制PCR反应液:

试剂名称	使用量		
Bestar [®] HRM Master Mix	10ul	12.5ul	25ul
50×ROX Reference Dye	0.4ul	0.5ul	1ul
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
DNA模板	1ul	1ul	2ul
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7.6ul	10ul	20ul
Total	20ul	25ul	50ul

备注:

1. 在20ul反应体系中, DNA模板的添加量通常在100 ng以下。因不同种类的DNA模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的DNA模板添加量。
2. 如果欲使用本产品进行2 Step RT-PCR反应的第二步PCR扩增反应, 第一步的RT反应液作为DNA模板时的添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。
3. 96孔板、Single-Tube、8联Tube采用50ul反应体系, 384孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate采用20ul反应体系。

2) 进行Real Time PCR反应。

建议采用下列显示的三步法PCR反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行PCR条件的优化(如采用二步法快速扩增程序)。

三步法PCR扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95℃ 2min

Stage 2: PCR反应

95℃ 10秒

60℃ 30~34秒*

72℃ 30秒

40 cycles

退火温度根据引物来设定。

使用7700和7900HT时请设定在30秒。

使用7000和7300时请设定在31秒。

使用7500时请设定在34秒。

Stage 3: HRM融解曲线

95℃ 15sec

60℃ 1min

60℃-95℃ (10sec/cycle 0.05℃/cycle)

60℃ 1min

备注: 1: 请先使用60℃ 30sec 二步法进行扩增(第三部72℃ 30sec取消),

如扩增结果不理想, 可尝试三步法扩增。

2: 做HRM融解曲线分析时, 一般设置为0.02~0.1℃收集一次荧光信号。

3) 实验结果分析。

反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和HRM融解曲线, 使用荧光定量仪器的软件进行HRM结果分析。