

2 × EvaGreen Master Mix 使用说明书

【产品组成】

| 产品名称 | 货号 | 规格 |
|-----------------------|----------|----------|
| 2×EvaGreen Master Mix | BG10401S | 1 mL |
| | BG10401M | 5 × 1 mL |
| | BG10401L | 25 mL |

【储存条件】 -20℃，避光保存，避免反复冻融。

【保质期】 12 个月(-15℃~ -25℃)

【应用范围】

1. 基因表达分析
2. 微阵列分析
3. 病毒载量测定
4. SNP（单核苷酸多态性）的筛查
5. 基因突变扫描
6. 甲基化的筛查

【产品说明】

本产品是结合了饱和染料 EvaGreen 和配体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶优势的 PCR 检测试剂，不仅可以进行实时荧光定量 PCR 分析，还能够进行高分辨率熔解曲线 (High Resolution Melting, HRM) 分析。EvaGreen 相比传统的 SYBR Green 染料，具有毒性小，对 PCR 反应抑制弱，可以接受较广的 pH 波动，同时

稳定性强，发光强度高的优点。经过优化的缓冲体系加上快速热启动 Taq DNA 聚合酶，可以抑制或将 PCR 反应中的非特异性 DNA 扩增最小化，三者组合的 2 × EvaGreen Master Mix 能够在宽广的范围内对 DNA 样进行更加准确的定量。另外，本产品中含有高浓度的 EvaGreen，可以使双链 PCR 产物结合量达到饱和状态，且不会抑制 PCR 反应，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，因此除了常规的可用于基因表达分析、微阵列分析、病毒载量分析外，还可用于已知 SNP 分析，以及未知突变基因扫描和甲基化 PCR 分析等研究。

2×EvaGreen Master Mix 是一种 2×Premix Type 试剂，包含除引物和样品 DNA 以外进行荧光定量 PCR 所需的所有成分，因此，在配制 PCR 反应液时十分方便简单。

【随酶提供试剂】

| 货号 | 规格 | ROX Reference Dye (50 ×) |
|----------|--------|--------------------------|
| BG10401S | 40 R | 200 μL |
| BG10401M | 200 R | 1 mL |
| BG10401L | 1000 R | 5 × 1 mL |

【配套荧光定量 PCR 仪器】

| | ROX Reference Dye (5 ×) | ROX Reference Dye (1 ×) | 无需加 Dye |
|------------|---|-------------------------|--|
| 荧光定量 PCR 仪 | ABI 7300、7700、7900、7900HT、7900HT Fast、StepOne、StepOnePlus | ABI 7500、ABI 7500 Fast | Bio-Rad CX96、CFX384、Roche 480、Thermo Scientific PikoReal Cyclers 等 |

【操作步骤】

如果要同时进行几个平行反应，混合无核酸酶水、引物、Rox Dye 和 2 × EvaGreen Master Mix 制备 PCR 混合液，为减少加样误差的影响，制备的反应混合液要在需要的反应数量上添加上一个额外反应，分装母液到单个的 PCR 管中，然后加入模板 DNA。

1. 温和震荡后，快速离心解冻后的所有溶液。
2. 加入 50 μL 的组份(见下表)到冰上的薄壁 PCR 管中。

| 反应组分 | 25 μL 体系 | 50 μL 体系 | 终浓度 |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| 10 μM 正向引物 | 0.5~1 μL | 1~2 μL | 0.2-0.4 μM |
| 10 μM 反向引物 | 0.5~1 μL | 1~2 μL | 0.2-0.4 μM |
| Rox Dye* | - | - | - |
| 模板 DNA | 可变量 | 可变量 | 可变量 |
| 2 \times EvaGreen Master Mix | 12.5 μL | 25 μL | 1 \times |
| 无核酸酶水 | 至 25 μL | 至 50 μL | - |

*Dox Dye 的加入量要根据上述所选用的仪器添加，如 ABI7900 则需加入 5 \times 染料，即 50 μL 体系加入 Rox Dye 量为 5 μL 。

3. 温和震荡并短暂离心。
4. 使用推荐的热循环条件进行荧光定量 PCR 反应。

两步法反应程序：

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 | 荧光信号采集 |
|---|---------|-------------|-----|--------|
| 预变性 | 95 °C | 1 min-3 min | 1 | 否 |
| 变性 | 95 °C | 5 sec | 40 | 否 |
| 退火/延伸 | 60 °C*1 | 30 sec | | 是 |
| 熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage) *2 | | | | |

三步法反应程序：

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 | 荧光信号采集 |
|---|------|-------------|-----|--------|
| 预变性 | 95 ℃ | 1 min-3 min | 1 | 否 |
| 变性 | 95 ℃ | 5 sec | 40 | 否 |
| 退火 | 60 ℃ | 20 sec | | 否 |
| 延伸 | 72 ℃ | 30 sec | | 是 |
| 熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage) *2 | | | | |

备注：

*1 请先使用60 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec进行扩增，如出现非特异性扩增，可尝试在60-66 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 收集一次荧光。

5. 实验结果分析

反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和熔解曲线，进行PCR定量时制作标准曲线等。（分析方法参见仪器的操作手册）

【注意事项】

1. 避免反复冻融，如需多次使用，请在第一次溶解后轻轻混匀本产品分装成小包装使用，-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
2. 模板：模板的添加量通常在 100 ng 以下，因不同种类的 DNA 模板中含有目标序列的拷贝数不同，必要时可稀释确定最佳的模板添加量。一个 50 μL 反应体系的模板量如下表，模板的添加量一般不要超过 PCR 总反应液体积的 10%。模板纯度 OD260/280 在 1.6~2.0，OD260/230 在 1.5~2.0。

| 模板 | 用量 |
|---------|-----------------|
| 基因组 DNA | 50 ng - 5 pg |
| cDNA | 100 ng - 100 fg |

3. 引物：通常引物浓度 0.4 μM 可以得到较好的结果，反映性能较差时可以在 0.2-1 μM 范围内调整引物浓度。
4. 使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，防止因混合不均匀造成的反应效果不佳。配制反应液时，请置于冰上，且要避免强光照射。
5. 反应液的配制、分装须比使用洁净无污染的枪头、离心管，尽量避免污染。
6. 禁止对荧光 PCR 专用反应管做任何标记，避免外源性荧光信号干扰。
7. 避免 PCR 反应管中试剂带有气泡，否则会产生非特异性的荧光信号。
8. 本产品附带的 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，方便客户针对不同信号荧光定量 PCR 仪时选择对应浓度使用。