



## CWStar HRM Master Mix

目录号： CW3382S (1 mL)

CW3382M (5 mL)

保存条件：  $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存，尽量避免反复冻融。

### 产品内容

Component	CW3382S 1mL	CW3382M 5mL
2×CWStar HRM Master Mix	1mL	5×1mL
RNase-Free Water	1mL	5×1mL

## 产品简介

CWStar HRM Master Mix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。

CWStar HRM Master Mix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。

## 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 Prism 7500/7500 Fast、ABI Prism 7900等仪器需要搭配ROX Reference Dye I，如需ROX Reference Dye I可联系当地业务员。

## 使用方法

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×CWStar HRM Master 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. PCR反应体系

试剂	20 $\mu$ L体系	50 $\mu$ L体系	终浓度
2 $\times$ CWStar HRM Master Mix	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	0.6 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	0.3 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	0.6 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	0.3 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Template DNA <sup>2)</sup>	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
ROX Reference Dye I <sup>3)</sup>	—	—	
RNase-Free Water	Up to 20 $\mu$ L	Up to 50 $\mu$ L	

注意：1) 通常引物浓度以0.3 $\mu$ M可以得到较好结果，可以在0.1–1.0 $\mu$ M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、Roche LightCycler 96、Qiagen Roter-Gene	不需ROX染料校正
ABI Prism 7500/7500 Fast	1 $\mu$ L/50 $\mu$ L体系，0.4 $\mu$ L/20 $\mu$ L体系
ABI Prism 7900	5 $\mu$ L/50 $\mu$ L体系，2 $\mu$ L/20 $\mu$ L体系

3. 混匀，短暂离心，将溶液收集到管底。

## 4. PCR反应程序

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 $^{\circ}$ C	30s–5min <sup>1)</sup>	1
变性	否	95 $^{\circ}$ C	10s	} 40–45 <sup>3)</sup>
退火/延伸	是	60 $^{\circ}$ C <sup>2)</sup>	30s	

熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Cure Stage) <sup>4)</sup>

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：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。