

## 北京启衡星生物科技有限公司 BEIJING FOREVERSTAR BIOTECH CO.,LTD.

# StarLighter Probe qPCR Mix (Universal) (StarLighter 探针法 qPCR预混液(通用型))

产品货号	单位规格
FS-Q2001-S	20 μL×100 rxns
FS-Q2002	20 μL×500 rxns
FS-Q2003	20 μL×1000 rxns

#### 产品简介:

StarLighter Probe qPCR Mix (Universal)是一款适用于探针法的Real time PCR (qPCR)反应的通用试剂。StarLighter Probe qPCR Mix (Universal) 是包含了除模板、引物、探针外所有组分的即用型试剂。它的核心组分是优选的热启动 Taq DNA polymerase ,配合针对qPCR优化的最适缓冲液,可以有效抑制非特异性扩增,大大增加qPCR扩增效率,适用于进行高灵敏度的qPCR反应。参比染料ROX随试剂盒提供。

本产品使用前只需要加入引物、模板、探针、ROX(根据使用的机型而定)、水。利用本产品可在广泛的定量区域内得到良好的标准曲线,对靶基因进行准确的定量、定性和SNP检测;具有重复性好,可信度高,兼容各种不同类型的qPCR探针的特点。

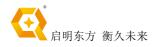
## 产品应用:

- 基因表达分析
- SNP和等位基因分型
- 测序和微阵列结果的验证

## 产品说明:

#### 储存和运输:

- 1. 冰上运输。
- 2. 到货后-20℃恒温冷冻冰箱避光保存。
- 3. 正确使用和保存时,产品能在保质期内保持良好性能。



## 质量控制:

StarLighter Probe Green qPCR Mix(Universal)所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及核酸污染。以人基因组DNA作为模板进行功能测试,并以5个浓度梯度制作标准曲线时,扩增效率为90 - 110 %,  $R^2 > 0.99$ 。

## 产品组成:

组分名称	FS-Q2001-S	FS-Q2002	FS-Q2003	保存条件
2× StarLighter Probe qPCR Mix (Universal)	1 mL	5 mL	10 mL	-15 至-25℃
50 × StarLighter Rox high	40 μL	200 μL	400 μL	-15 至 <i>-</i> 25℃,
50 × StarLighter Rox low	40 μL	200 μL	400 μL	避光保存

注:请按照推荐的储存温度保存,避免反复冻融。

#### 仪器与ROX参比染料对照表:

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne <sup>TM</sup> , and StepOnePlus <sup>TM</sup>	ROX High
Applied Biosystems® 7500,ViiA <sup>TM</sup> 7,QuantStudio <sup>TM</sup> 12K Flex, Agilent Mx3000P <sup>TM</sup> , Mx3005P <sup>TM</sup> , and Mx4000 <sup>TM</sup>	ROX Low
Rotor-Gene <sup>TM</sup> , DNA Engine Opticon <sup>TM</sup> , Opticon <sup>TM</sup> 2, Chromo 4 <sup>TM</sup> Real-Time Detector, Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Roche LightCycler® Nano, Bio-Rad CFX96, and Illumina Eco <sup>TM</sup>	No ROX

## StarLighter Probe qPCR Mix (Universal) 操作流程

- 1、操作步骤
- 1.1 使用试剂前确保彻底融化并混匀,加入反应体系的所有模板、引物、染料等组分也应充分混匀:
- 1.2 计算所加各组分的体积(参考下面表格),并小心吸取准确体积到PCR 反应管内, (注意粘稠液体需尽量减少枪头黏附);
- 1.3 盖好PCR 管盖, 瞬时离心。

组分	20 μL体系	终浓度
2 × StarLighter Probe qPCR Mix	10 μL	1 ×
10 μM Forward Primer	0.2 - 0.8 μL	100 - 400 nM
10 μM Reverse Primer	0.2 - 0.8 μL	100 - 400 nM
10 μM Probe	0.2 - 1.0 μL	100 - 500 nM
Template	As required	/
50 × Rox Low/High	0.4 μL	1 ×
PCR-grade water	补至 20 μL	/

a.反应体积可以在5-25 μL范围调整(各组分按比例变化),不建议>50 μL。

#### 2、反应程序

- 推荐使用快速运行模式
- qPCR程序参考下表设置

Step	Temperature	Duration	Cycles	
Enzyme Activation	95°C	3 min	1	
Denaturation	95°C	10 - 20sec	25 45	
Annealling/Extention/Data Acquisition	55 - 65°C	30 - 50sec	35 - 45	

a. 预变性时间应设置在3 min,若模板GC 含量较高可适当延长预变性时间至5 min。

## 常见问题与解决方法:

## A: 扩增曲线异常

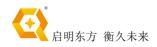
- 1、扩增曲线不光滑:
- 系统需要校正, 提高模板浓度:
- ROX 使用错误,更换正确的ROX 类型。
- 2、扩增曲线断裂或下滑:
- 模板浓度高, 提高阈值并重新分析数据:
- 降低模板浓度。
- 3、个别扩增曲线骤降:
- 反应管有气泡,上机前应先离心。

b.本试剂中含有Mg2+, 无需额外再加。

c.使用时共同组分最好先配成预混液。

b.退火延伸温度需要依据引物和探针Tm 值确定,

c.初次可使用 60℃, 20s 做预实验,最低延伸退火时间在不同仪器上会有不同。



#### B: 反应结束无扩增曲线

- 1、循环数不够:一般设40个循环,但过多循环数会增加背景信号,降低数据可信度。
- 2、确认程序中是否设置信号采集:两步法的扩增程序一般在退火/延伸阶段采集信号; 三步法扩增信号采集设置在延伸阶段。
- 3、引物降解: PAGE 检测排除其降解的可能性。
- 4、模板浓度太低:减少稀释度重复实验,先从高浓度做起。
- 5、模板降解:重新制备模板。

#### C: Ct 值太高

- 1、扩增效率低:优化反应条件,尝试三步法扩增或重新设计合成引物。
- 2、模板浓度低:减少模板稀释度,先从高浓度做起。
- 3、模板降解:重新制备模板。
- 4、PCR产物太长: 推荐PCR产物长度80-150 bp。
- 5、存在PCR抑制剂: 若为模板带入,加大模板稀释倍数或重新制备模板。

#### D: 阴性对照出现明显扩增

- 1、反应体系污染: 更换新的Mix、水、引物等重复实验; 反应体系在超净工作台内配制,减少气溶胶污染。
- 2、引物设计不合理: 重新设计并合成引物。

### E: 标准曲线线性关系不佳

- 1、加样误差: 提高模板稀释倍数, 提高加样体积。
- 2、标准品降解:重新制备标准品。
- 3、模板浓度太高: 提高模板稀释倍数。

## F: 实验重复性差

- 1、加样体积不一致:使用更好的移液枪;将模板做高倍稀释,加大模板加入的体积。
- 2、模板浓度太低:模板浓度越低,重复性越差,减少模板稀释度或提高加样体积。

北京启衡星生物科技有限公司

地址: 北京市昌平区生命园西环路21号楼南楼三层

网址: www.qihengxing.com

电话: 010-62149251

邮箱: sales@qihengxing.com marketing@qihengxing.com

support@qihengxing.com



扫码关注 了解更多产品信息 本产品仅供研究,不做为临床诊断使用

版本号: V1