



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

## StarLighter SYBR® Green qPCR Mix (Universal) (StarLighter 染料法 qPCR预混液 (通用型))

产品货号	单位规格
FS-Q1001-S	20 μL×100 rxns
FS-Q1002	20 μL×500 rxns
FS-Q1003	20 μL×1000 rxns
FS-Q1004	20 μL×5000 rxns

### 产品简介:

StarLighter SYBR Green qPCR Mix (Universal) 是一款含基因工程改造的热启动DNA聚合酶的染料法 qPCR Mix。该酶耐受体系中高浓度的 SYBR Green I 染料, 可使反应体系中有更多的染料与双链 DNA 结合, 有效提高荧光信号值, 降低荧光信号达到阈值所需的循环数 (Ct值), 提高信噪比和灵敏度。

2 × StarLighter SYBR Green qPCR Mix 包含了除模板, 引物外所有的组分。优化的缓冲液体系可以有效抑制非特异性扩增, 数据结果更可靠。产品能有效扩增复杂模板, 如高 AT/GC 的目的片段, 抗抑制能力强, 产品适用性强。参比染料Rox随试剂盒提供。

### 产品应用:

- 基因表达分析
- 低拷贝基因检测
- 基因敲除验证
- 测序和微阵列结果的验证
- RNA拷贝数检测 (病毒及病菌等检测)
- NGS文库绝对定量等

### 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。

### 操作注意事项:

尽量减少 StarLighter SYBR Green qPCR Mix 暴露在直射光源下的时间。长时间暴露在直射光下可能会导致荧光信号强度降低。在使用前请务必确保产品已完全融化并充分混匀。

版本号: V1



## 质量控制:

StarLighter SYBR 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-Q1001-S	FS-Q1002	FS-Q1003	FS-Q1004	保存条件
2× StarLighter SYBR Green qPCR Mix	1 mL	5 mL	10 mL	50 mL	-15 至 -25°C
50 × StarLighter Rox high	40 μL	200 μL	400 μL	2 mL	-15 至 -25°C, 避光保存
50 × StarLighter Rox low	40 μL	200 μL	400 μL	2 mL	

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™, and StepOnePlus™	ROX High
Applied Biosystems® 7500, ViiA™7, QuantStudio™ 12K Flex, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™, and Mx4000™	ROX Low
Rotor-Gene™, DNA Engine Opticon™, Opticon™ 2, Chromo 4™ Real-Time Detector, Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, Roche LightCycler® Nano, Bio-Rad CFX96, and Illumina Eco™	No ROX

## StarLighter SYBR Green 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黏附）；

1.3 盖好PCR 管盖，瞬时离心。

组分	20 μL体系	终浓度
2 × StarLighter SYBR Green qPCR Mix	10 μL	1 ×
10 μM Forward Primer	0.2 - 1 μL	100 - 500 nM
10 μM Reverse Primer	0.2 - 1 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5-50 μL范围调整（各组分按比例变化）。

b. 本试剂中含有 $Mg^{2+}$ ，终浓度是2.5 mM，无需额外再加。

c. 使用时共同组分最好先配成预混液。



## 2、反应程序

- 推荐使用快速运行模式
- qPCR程序参考下表设置

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	10 - 20sec	35 - 45
退火/延伸/数据采集	55 - 65°C	30 - 50sec	
溶解曲线分析	根据仪器使用说明设置		

- 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。
- 退火延伸温度需要依据引物和探针T<sub>m</sub> 值确定，
- 初次可使用 60°C，20s 做预实验，最低延伸退火时间在不同仪器上会有不同。

## 3、结果分析

- 通过溶解曲线分析反应的特异性
- 根据实验设计决定数据分析方法

### 重要参数：

#### 模板

高浓度的模板会增加背景荧光并降低标准曲线的线性关系。为获得最佳定量结果，每 20 $\mu$ L 反应体系最多使用20 ng 基因组DNA 或质粒 DNA（对于较小体积，模板量应按比例减少）。对于两步法 RT-PCR，最多使用由 1 $\mu$ g 总 RNA 反转录得到的cDNA，并且模板 cDNA 的体积不应超过总反应体积的 10%。

#### 引物

高质量的引物设计和纯化（推荐使用HPLC 纯化）可以最大限度地减少由于非特异性扩增造成的灵敏度降低，而这种降低在低浓度下更容易发生。为使实验的灵敏度更高，应在不影响反应效率的前提下使用更低的引物浓度（每条引物 50-400 nM。为获得最佳效果，一般设计扩增长度为 60-400bp 的引物。使用适当的引物设计软件来设计引物，并使其溶解温度在60°C左右，以更好利用两步法的循环程序。如果进行qRT-PCR，我们建议设计来源于mRNA的cDNA引物，这样可以防止基因组DNA扩增造成的污染和mRNA 定量不准确。

#### StarLighter DNA 聚合酶

StarLighter DNA 聚合酶是由 Taq DNA 聚合酶经基因工程改造而来，特异应用于使用 SYBR Green I 染料的实时荧光定量PCR。StarLighter DNA 聚合酶在室温下无活性，可防止预混液制备时形成引物错配产物和引物二聚体，保证qPCR反应的特异性和准确定量。酶在qPCR 的预变性步骤 20 秒后即被激活，表现出完整的活性；然而复杂模板的完全变性可能需要3-5分钟。酶的热启动特性规避了在配制反应体系过程中冷却的需求。

#### ROX 参比染料

对于特定 qPCR 仪，ROX 参比染料可补偿荧光检测中非 PCR 造成的相关变化。ROX参比染料的荧光水平qPCR 过程中并不发生显著变化，但能为 PCR 相关荧光信号的标准化提供稳定的基线。因此，ROX 染料补偿了由于反应体积的轻微变化或孔位的差异而造成的信号检测差异。预混物中 ROX 染料的存在不会干扰任何仪器上的 qPCR，因为染料本身不参与反应，与 SYBR Green I 的发射光谱也不同。



## SYBR Green I

StarLighter SYBR Green qPCR Mix(2×)含有高浓度的荧光染料 SYBR Green I。通过基因工程修饰的 DNA 聚合酶对高浓度的 SYBR Green I 有较高的耐受性，使得扩增产生较高的信号强度。SYBR Green I 会结合所有双链DNA分子，在结合时发出荧光信号。

### 氯化镁

StarLighter SYBR Green qPCR Mix (2 ×)包含最佳的MgCl<sub>2</sub> 浓度。不需要额外增加MgCl<sub>2</sub> 的浓度以提高反应效率和特异性。

常见问题及解决办法		
问题	可能原因	解决办法
在NTC(无模板对照)有信号峰 在样本的熔解曲线中出现次要的非特异峰	在NTC中出现信号或样本出现非特异扩增的有很多原因，包括： 1、污染 2、由于以下原因形成引物二聚体 ·非最佳引物结合温度（一般由于qPCR体系的差异造成） ·引物和/或模板的降解 ·引物应该用 10mM Tris-HCL (PH8.0-8.5) 储存和稀释 ·合成的引物质量问题 ·引物设计问题	利用熔解曲线或琼脂糖凝胶来分析产物是否特异及有无引物二聚体生成。 如果NTC有特异产物，则证明体系被污染了。 ·舍弃所有试剂，清洁移液器和操作台，配置新鲜引物。 注意：当使用含有野生型Taq DNA聚合酶的竞争试剂盒没有检测到污染时，由于启衡星qPCR试剂盒的灵敏度较高，可能会检测到低水平的污染。 如果NTC和/或样品含有非特异性产物，可能需要进行方法优化： ·对于大多数测试，建议使用 30 s的组合退火/延长时间，更长的时间可能会导致非特异性扩增。 ·以3 °C 为增量提高退火/延伸温度。 ·降低引物浓度。 重新合成或设计引物，推荐使用HPLC纯化的引物进行低拷贝数检测，这也会减少引物二聚体。
低荧光强度	不正确的操作 ROX参比染料浓度错误	SYBR Green I 染料是光敏感的，避免直接暴露于光线下或反复冻融。在使用前要使溶液全部溶解并混匀。 如果加入错误浓度的 ROX 参比染料，校准后的信号可能会低于预期(加入过多ROX)，或高于预期(加入过少ROX)。如果使用ABI仪器，可以在扣除ROX的情况下分析原始数据。
特定产物的熔解温度不同于竞品试剂盒熔解温度	qPCR预混液的缓冲液成分不同（比如盐浓度）	预混液配方差异可能会稍微影响PCR产物熔解温度。在含有较高盐浓度的反应缓冲液中，特定DNA片段将在较高温下熔解，一般不影响检测结果分析。

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