



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

StarLighter SYBR[®] Green qPCR Mix (Universal)

产品货号	单位规格
FS-Q1001	1mL, 100×20μL rxns
FS-Q1002	5mL, 500×20μL rxns

产品简介:

StarLighter SYBR[®] Green qPCR Mix是一款含基因工程酶的qPCR试剂。该酶耐受体系中高浓度的SYBR[®] Green染料, 可使反应体系中有更多的染料能与双链DNA进行结合, 提高荧光信号值, 可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。

StarLighter SYBR[®] Green qPCR Mix特异性强, 能有效减少非特异性扩增, 数据结果更加可靠。产品能有效扩增复杂模板, 如高AT或高GC的目的片段。抗抑制剂能力强。

StarLighter SYBR[®] Green qPCR Mix是一种即用型试剂盒, 含有除引物和模板以外的所有组分, 用于qPCR中DNA的扩增和检测。该试剂是以2×的预混液形式提供, 含有抗体调节的热启动酶, SYBR[®] Green I荧光染料, MgCl₂, dNTPs和稳定剂等。ROX参比染料单独提供, 不包含在2× Mix中。

产品组分：

组分	FS-Q1001	FS-Q1002	FS-Q1003	FS-Q1004	浓度	储存条件
2× StarLighter SYBR®Green qPCR Mix(Universal)	1mL	5mL	10mL	50mL	2×	-20℃ 避光保存
50× StarLighter Rox High	40μL	200μL	400μL	2mL	50×	-20℃ 避光保存
50× StarLighter Rox Low	40μL	200μL	400μL	2mL	50×	-20℃ 避光保存

注：请按照推荐的储存温度保存，避免反复冻融。

产品应用：

StarLighter SYBR Green qPCR Mix主要应用：

基因表达分析；

低拷贝数基因检测；

基因敲除验证；

基因表达验证；

RNA拷贝数检测（病毒及病菌等检测）；

NGS文库的绝对定量。

产品说明：

运输和存储：

干冰储存条件下运输；产品到货后，将试剂盒各组分放置-20℃恒温冷冻箱中避光保存。正确储存及使用，该试剂盒在有效期内能够保持最好的性能。

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合。

质量控制：

StarLighter SYBR Green qPCR Mix没有被任何DNA酶和RNA酶污染。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，反应效率为90-110%， $R^2 > 0.99$ 。

注意事项:

- . 2X预混液包含新型基因工程酶和专用缓冲体系，能够提高富含GC和AT模板的扩增效率。
- . 95°C处理20秒足以激活体系中的热启动DNA聚合酶活性，当使用复杂模板时，建议预变性3分钟。
- . 对于两步法，退火/延伸时间为至少20秒（视具体机型而定）。
- . 反应体系勿超过25 μ L。

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

实验步骤:
1. 准备qPCR预混液

- 1.1 保证所有反应组分都全部融解并完全混匀。
- 1.2 把所有共同的组分配成预混液。
- 1.3 按照下面表格计算每个组分所需要的体积。

组分	20 μ L rxn ¹	终浓度
H ₂ O (PCR级)	至总体积20 μ L	N/A
2 \times StarLighter SYBR® Green qPCR Mix(Universal)	10 μ L	1x
10 μ M 正向引物	0.2-1 μ L	100-500 nM
10 μ M 反向引物	0.2-1 μ L	100-500 nM
DNA模板 ³	按需	<20 ng
50 \times ROX High/Low (按需) ⁴	0.4 μ L	1x

1 反应体积可以在5-25 μ L范围内调整（各组分按比例变化），不建议>25 μ L。

- 2 SYBR Green Mix中包含MgCl₂，终浓度是2.5mM。
- 3 20μL反应体系，模板的量不超过20ng。
- 4 所有Applied Biosystems®仪器都需要使用ROX染料。Agilent Mx3000P™、Mx3005P™ 和Mx4000™循环仪中ROX是可选的，Bio-Rad / MJ Research, Cepheid, Corbett / Qiagen, Eppendorf, Illumina和Roche仪器不需要ROX染料。

2. 单个反应的配制

- 2.1将适当体积的qPCR预混液、模板和引物转移到PCR管/板的孔中。
- 2.2盖上PCR管或用膜封上PCR板，短暂离心。

3. qPCR运行程序

- 3.1推荐使用快速运行模式
- 3.2 qPCR程序参考下图设置

步骤	温度	时间	循环
酶激活	95 °C	3min ¹	
变性	95 °C	10-30sec	35-40
退火/延伸 数据采集 ³	60 °C	≥ 20 sec ²	
熔解曲线	根据仪器使用说明		

- 1 95°C处理20秒足以激活DNA聚合酶的活性，但是对于复杂模板的变性可能需要延长至3分钟。
- 2 选择适合仪器的最短退火/延伸时间，但不能少于20秒。
- 3 对于3步法，根据仪器指南，在最佳退火温度下退火20秒，然后以最短时间在72°C进行数据采集。

注意：上述循环参数不适用于基于qPCR方法的NGS文库定量。文库定量请参阅启衡星文库定量试剂盒说明书。

4. 结果分析

- 4.1通过熔解曲线分析反应的特异性。
- 4.2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 μ 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 μ 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50-400nM）。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，并使其熔解温度在60 $^{\circ}$ 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在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 (2X) 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 (2X) 包含最佳的MgCl₂浓度。不需要额外增加MgCl₂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
<p>在NTC (无模板对照) 有信号峰</p> <p>在样本的熔解曲线中出现次要的非特异峰</p>	<p>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：</p> <p>1.污染</p> <p>2.由于以下原因形成引物二聚体</p> <ul style="list-style-type: none"> .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，不要用PCR级H₂O .合成的引物质量问题 .引物设计问题 	<p>利用熔解曲线或胶来分析产物是否特异及有无引物二聚体生成</p> <p>如果NTC有特异产物，则证明体系被污染了</p> <ul style="list-style-type: none"> .舍弃所有试剂，清洁移液器和操作台，配置新鲜引物。 <p>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，由于启明星qPCR试剂盒的灵敏度增加，可能会检测到低水平的污染。</p> <p>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：</p> <ul style="list-style-type: none"> .对于大多数测试，建议使用30秒的组合退火/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。 .降低引物溶度 .重新合成或重新设计引物，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	<p>不正确的操作</p> <p>ROX参比染料浓度错误</p>	<p>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</p> <p>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，可以在消除ROX的情况下分析原始数据</p>
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）	<p>预混液配方的差异可能会稍微影响产品的熔解浓度。</p> <p>在含有较高盐浓度的反应缓冲液中，特定DNA片段将在较高温度下溶解，一般不影响检测结果分析</p>

北京启衡星生物科技有限公司

地址：北京市海淀区西直门外高粱桥斜街19号院3号楼209室

网址：www.qihengxing.com

Tel: 010-62149251

E-mail: sales@qihengxing.com marketing@qihengxing.com

support@qihengxing.com



扫码关注
了解更多产品信息