

Version: AH 3.2 (2021.04.01修订)

## 2×Spark Probe qPCR Mix

目录号: AH0201

### 01/产品组分

序号	组分	AH0201 500 rxn (20μL/rxn)
1	2×Spark Probe qPCR Mix	1.25 mL×4
2	50×ROX Reference Dye 1*	200 μL
3	50×ROX Reference Dye 2*	200 μL

\*ROX Reference Dye用于校正孔与孔之间的荧光信号误差。不同机型使用情况参见下表:

ROX Reference Dye 1	ABI 5700/7000/7300/7700 /7900/7900HT/7900HT Fast , ABI Step One, ABI Step One Plus
ROX Reference Dye 2	ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Quant Studio 3/5/ 6 Flex/7 Flex/12k Flex, Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P
不需要ROX Reference Dye	Bio-Rad iQ5/Chromo4/iCycler iQ/CFX96/CFX384/Opticon/Opticon 2/MyiQ/MiniOpticon, Eppendorf realplex 2s/Mastercycler ep realplex, Qiagen Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000 , Roche LightCycler 2.0/LightCycler 96/ LightCycler 480

### 02/保存条件

本产品所有组分-20℃避光保存。

### 03/产品概述

本产品是使用探针法进行 qPCR 的专用试剂。本产品基于热启动的 DNA Polymerase，配合针对 qPCR 优化的最适 Buffer，可以有效抑制非特异扩增，显著提高扩增效率，适用于高灵敏度的 qPCR 反应。本产品是一种 2×Mix 预混合试剂，使用方便。使用本产品进行 qPCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量，检测结果重复性好，可信度高。

## 04/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
- ◇ 本制品含独立包装参比染料 ROX，客户可根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需要加 ROX 和加入浓度，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。
- ◇ 使用前请上下颠倒以混匀 Mix，请勿涡旋以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，影响定量结果。Mix 经混匀轻微离心后即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎 Mix 起泡，需再次离心方可使用。
- ◇ 由于本品检测灵敏度极高，即使空气中有微量气溶胶都可以引起污染，而导致实验失败，因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件允许的实验室推荐使用专用的取液枪，避免污染。推荐使用带滤芯的枪头。

## 05/建议PCR条件（以不同机型举例，选择本实验室机型程序即可）

需要 ROX Reference Dye 2 校准的操作方法，以 ABI 7500 为例；以 10  $\mu\text{L}$ ，20  $\mu\text{L}$  反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

### 1. 配制PCR反应液：

Components	Volume (10 $\mu\text{L}$ )	Volume (20 $\mu\text{L}$ )	Final Concentration
2 $\times$ Spark Probe qPCR Mix	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	1 $\times$
DNA/cDNA	X $\mu\text{L}$	X $\mu\text{L}$	as required
Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.2 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$ each
Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.2 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$ each
TaqMan Probe (10 $\mu\text{M}$ )	0.1 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{M}$ each
50 $\times$ ROX Reference Dye 2	0.2 $\mu\text{L}$	0.4 $\mu\text{L}$	as required
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu\text{L}$	up to 20 $\mu\text{L}$	

▲ 反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2  $\mu\text{M}$  即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0  $\mu\text{M}$  范围内调整引物浓度。
- 2) 探针终浓度可以在 50-250 nM 之间调整。
- 3) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。建议将模板稀释后加入反应体系中，可有效提高实验的重复性。
- 4) 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

## 2. qPCR反应程序设置

Stage1	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage2	循环反应*	Reps: 40	95°C	10 sec
			60°C	34 sec

\* 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7500 时至少 34 sec。

3. 反应结束后确认qPCR的扩增曲线，进行标准曲线制作等。PCR扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。

**需要 ROX Reference Dye 1 校准的操作方法，以 ABI Step One Plus 为例；以 10 μL, 20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格**

**Final Concentration 所示比例进行调整配制：**

### 1. 配制PCR反应液：

Components	Volume (10 μL)	Volume (20 μL)	Final Concentration
2×Spark Probe qPCR Mix	5 μL	10μL	1×
DNA/cDNA	X μL	X μL	as required
Forward Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μL	0.2 μL	0.1 μM each
50×ROX Reference Dye 1	0.2 μL	0.4 μL	as required
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 μL	up to 20 μL	

▲ 反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- 2) 探针终浓度可以在 50-250 nM 之间调整。
- 3) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。建议将模板稀释后加入反应体系中，可有效提高实验的重复性。
- 4) 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

## 2. qPCR反应程序设置

Stage1	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage2	循环反应*	Reps: 40	95°C	10 sec
			60°C	30 sec

\* 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 sec；使用 ABI Step One Plus 时至少 10 sec。

3. 反应结束后确认qPCR的扩增曲线，进行标准曲线制作等。PCR扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。

**不需要 ROX Reference Dye 校准的操作方法，以 Roche LightCycler 480 为例；以 10 μL, 20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格**

**Final Concentration 所示比例进行调整配制：**

### 1. 配制PCR反应液：

Components	Volume (10 µL)	Volume (20 µL)	Final Concentration
2×Spark Probe qPCR Mix	5 µL	10µL	1×
DNA/cDNA	X µL	X µL	as required
Forward Primer (10 µM)	0.2 µL	0.4 µL	0.2 µM each
Reverse Primer (10 µM)	0.2 µL	0.4 µL	0.2 µM each
TaqMan Probe (10 µM)	0.1 µL	0.2 µL	0.1 µM each
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 µL	up to 20 µL	

▲反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整:

- 1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 µM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时, 可以在 0.1-1.0 µM 范围内调整引物浓度。
- 2) 探针终浓度可以在 50-250 nM 之间调整。
- 3) qPCR 灵敏度极高, 建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。建议将模板稀释后加入反应体系中, 可有效提高实验的重复性。
- 4) 如模板类型为未稀释 cDNA 原液, 使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

## 2. qPCR反应程序设置

Stage1	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage2	循环反应*	Reps: 40	95°C	10 sec
			60°C	30 sec

\* 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整。

3. 反应结束后确认qPCR的扩增曲线, 进行标准曲线制作等。PCR扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。

## 06/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (含基因组 DNA 清除柱)

AC1709 RNase Free and DNase Free 纯水

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)

AH0202 2×Spark Depolluting Probe qPCR Mix

AH0203 2×Spark Universal Depolluting Probe qPCR Mix

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

