

Version: AH 4.0 (2022.08.11修订)

2×Spark Depolluting Probe qPCR Mix

目录号: AH0202

01/产品组分

序号	组分	AH0202 500 rxn (20μL/rxn)
1	2×Spark Depolluting 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。核心组分 DNA Polymerase 是基于化学法修饰的热启动 DNA 聚合酶,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。试剂中引入了 dUTP/UDG 防污染系统, 可完全消除扩增产物污染对 qPCR 的影响。本产品是一种 2×Mix 试剂, 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/质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以 HeLa 细胞总 RNA 的逆转录产物稀释液为模板，扩增 3 个基因，扩增曲线在批次间的产品中相近。用含 U 的 DNA 片段作为模板，UDG 防污染系统的清除效率超过 99.99%。

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 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。
- ◇ 建议 PCR 反应液在冰上配制，可以提高扩增特异性，减少背景。
- ◇ 请冰上融化后，轻轻上下颠倒，混合均匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。

06/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 μ L，20 μ 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 μ L)	Volume (20 μ L)	Final Concentration
2 \times Spark Depolluting Probe qPCR Mix	5 μ L	10 μ L	1 \times
DNA/cDNA	X μ L	X μ L	as required
Forward Primer (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M each
Reverse Primer (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M each
TaqMan Probe (10 μ M)	0.1 μ L	0.2 μ L	0.1 μ M each
50 \times ROX Reference Dye 2	0.2 μ L	0.4 μ L	as required
RNase Free H ₂ O	up to 10 μ L	up to 20 μ 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 μ M 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1-1 μ 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，不能使用 ROX 标记的探针。
- 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的 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

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37°C	2 min
Stage 2	预变性*1	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 3	循环反应*2	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	34 sec

1 DNA Polymerase 需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置 PCR 反应预变性条件为 95°C 5 min；如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 10min。

2 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。

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 Depolluting Probe qPCR Mix	5 μL	10 μL	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 ₂ 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，可以在终浓度 0.1-1 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，不能使用 ROX 标记的探针。
- 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的 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

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37°C	2 min
Stage 2	预变性*1	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 3	循环反应*2	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	30 sec

1 DNA Polymerase 需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置 PCR 反应预变性条件为 95°C 5 min；如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 10min。

2 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。

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 Depolluting Probe qPCR Mix	5 μL	10 μL	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 ₂ 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，可以在终浓度 0.1-1 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的 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

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37°C	2 min
Stage 2	预变性*1	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 3	循环反应*2	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	30 sec

1 DNA Polymerase 需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置 PCR 反应预变性条件为 95°C 5 min；如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 10min。

2 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。

07/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)

AH0201 2×Spark 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

