



## 2×RealStar MethyLight qPCR Mix

### 2×RealStar 甲基化 qPCR 预混液

版本号: V241201

货号: A371  
保存: -20°C  
运输: 低温

货号	规格
A371-01	1.1 ml
A371-10	1.1 ml×10

#### 【产品概述】

本产品为甲基化检测专用的 Taqman 探针法 qPCR 预混液, 适用于检测经亚硫酸盐转化后的 DNA 模板。针对甲基化 qPCR 应用场景, 提高了该预混液中 Taq 酶对亚硫酸氢盐处理后 DNA 模板的耐受性, 同时对该酶适配的缓冲液进行优化, 使其具有更好的扩增能力和反应体系稳定性, 确保在 DNA 甲基化模板检测场景下对靶标检测的高灵敏度和高特异性, qPCR 扩增效率高、重复性好。

#### 【产品特点】

- GC 兼容性强: GC 含量 20-70% 均可扩增。
- 适用模板类型多: 基因组 DNA、质粒 DNA、λDNA, 亚硫酸氢盐处理后 DNA。
- 适用样本范围广: 粪便、尿液、肺泡灌洗液、血液、脱落细胞等。

#### 【产品组分】

组分货号	组分名称	A371-01	A371-10
ZA371-101	2×RealStar MethyLight qPCR Mix	1.1 ml	1.1 ml×10

#### 【保存条件】

-20°C 保存, 避光, 保质期 24 个月, 避免反复冻融。如果经常使用, 可置于 4°C 保存至少 3 个月。

#### 【使用方法】

用户需自备的试剂: cDNA 或 DNA 模板、引物、探针。

使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。

操作示例: 以 20 μl 体系为例

##### 1. PCR 反应体系

组分	用量
DNA 模板 <sup>a</sup>	X μl
Primer Mix <sup>b</sup>	0.1-1.0 μM
TaqMan Probe Mix <sup>c</sup>	50-250 nM
2×RealStar MethyLight qPCR Mix	10 μl
Sterile Water	补足至 20 μl

<sup>a</sup>模板量: 不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。

<sup>b</sup>引物: 一般反应体系中引物终浓度为 0.2 μM。当反应性能比较差时, 可以在终浓度 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。

<sup>c</sup>探针: 探针终浓度可以在 50-250 nM 之间调整。

##### 2. PCR 反应程序设置

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	3 min	1
变性	95°C	10 s	35-45
退火-延伸	60°C	30 s <sup>d</sup>	

<sup>d</sup>延伸时间请根据您的 Real-time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整。本产品适用但不限于以下仪器: ABI QuantStudio 5、ABI 7500、Bio-Rad CFX 96、Roche LightCycler 480、博日 Linegene 9600、宏石 SLAN 96 等。



### 【补充说明】

#### 引物设计

1. 对于亚硫酸氢盐转化后的 DNA 模板，引物设计需根据转化后产物序列来设计，即未甲基化的 C 在转化后应为 U，设计引物时视为 T；推荐使用引物设计程序设计，如 MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)；亚硫酸氢盐转化后的正义链和反义链不互补，设计引物时需注意与一般 DNA 设计引物不同。
2. 引物长度在 20-40 nt 之间。
3. 引物 3'端应避免出现发夹结构。
4. 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1°C 为佳，Tm 值调整至 55-65°C。
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算。
6. 引物内部或两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列，两条引物的 3'端避免有 3 个碱基以上的互补序列。
7. 引物设计完请使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性，以避免非特异性扩增产生。

#### TaqMan 探针设计

1. 探针序列应尽量接近正向或者反向引物，但是不能与之有重合区域。
2. 探针长度一般为 18-40 bp。
3. 应避免连续相同的碱基出现，如 GGGG 或者更多的连续 G 出现。
4. 探针 5'端应避免使用碱基 G。
5. 探针的退火温度应为 65-67°C。
6. 如果序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。