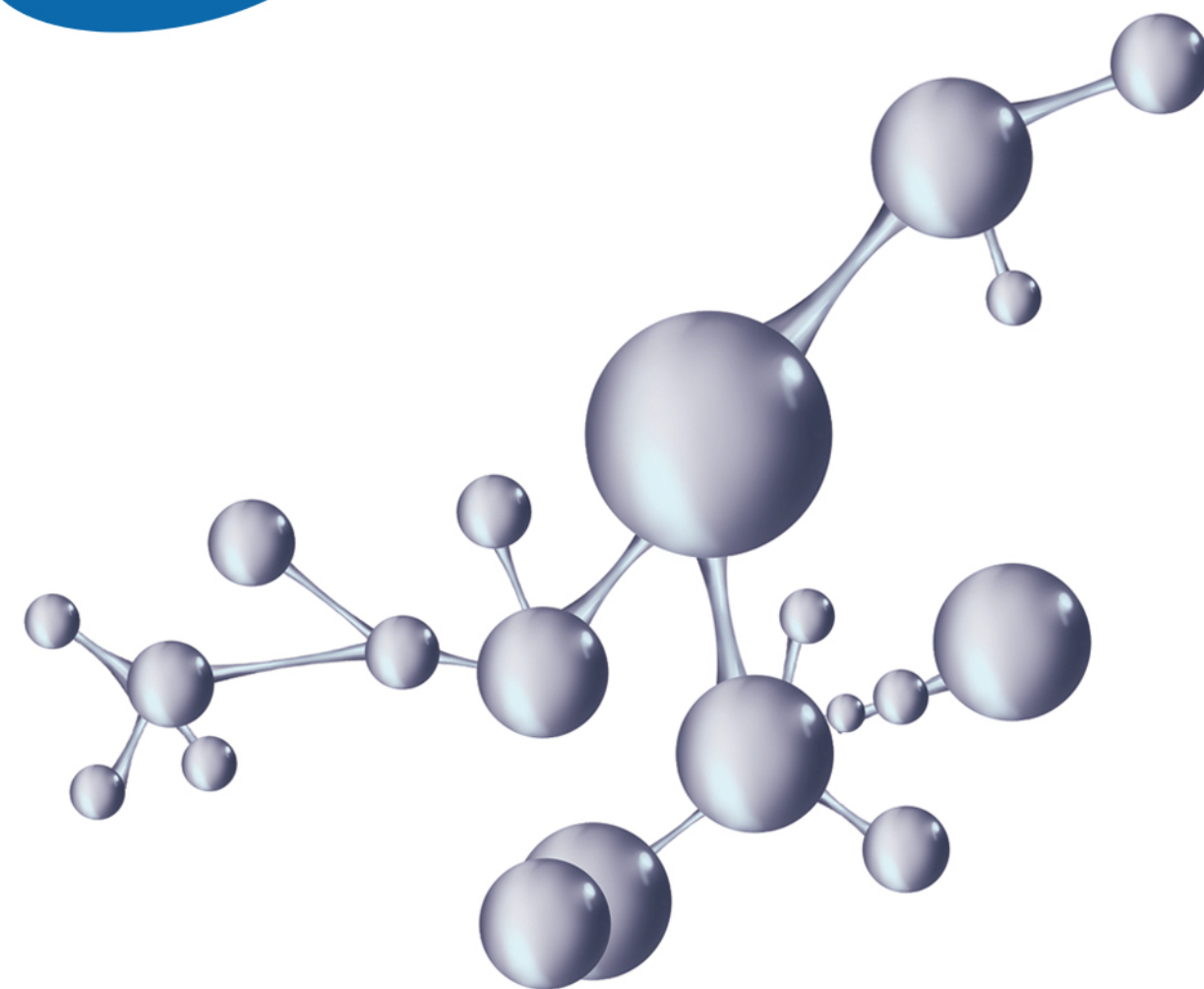




官方二维码

扫一扫 了解更多



HRK HS SYBR Green qPCR Kit

使用说明书

☎ 010-69738937

🌐 www.huaruikang.com.cn

📍 北京市昌平区北清路1号院珠江摩尔大厦3号楼

www.huaruikang.com.cn

HRK HS SYBR Green qPCR Kit

使用说明书

【目录号】

HRK-Q2401-1 (100 rxns)

HRK-Q2401-2 (500 rxns)

【产品组分】

试剂成分	100 rxns	500 rxns
2×HRK HS SYBR Green qPCR Master Mix	1 ml	5 ml
50×ROX Reference Dye	40 µl	200 µl

备注：50×ROX Reference Dye 用于校正加样孔之间的体积误差和荧光信号误差，不同仪器的使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, 7900HT Fas, StepOne™, and StepOnePlus™	使用 ROX 终浓度为 1×
Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7; QuantStudio™ instruments, ViiA™7, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™ and Mx4000™	使用 ROX 终浓度为 0.1×
Rotor-Gene™ instruments, DNA Engine Opticon™, Opticon™ 2, Chromo 4™ Real-Time Detector, Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycler® 480, 96, Nano, Bio-Rad CFX96, Thermo Scientific PikoReal Cycler, Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; 以及一些无 ROX 校正模块的国产仪器，如宏石、博日和鲲鹏等	无需添加 ROX Reference Dye

说明：

- 1、在配制 qPCR 混合液之前，每 1 ml Mix 中加入 40 µl 50×ROX 或者 4 µl 50×ROX （根据 qPCR 实验仪器型号决定加入体积），用 1 ml 移液器轻轻混匀。
- 2、使用无需 ROX Reference Dye 校正的 qPCR 仪器时，则无需添加 ROX。

【产品简介】

HRK HS SYBR Green qPCR Master Mix 是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混液。含有混合的抗体法修饰热启动聚合酶，可以有效抑制样品准备过程中的非特异性扩增，且具有检测灵敏度高，特异性强等优点。本产品采用优化的 PCR Buffer，不仅可以提高 PCR 的扩增效率，同时能够高效扩增 GC 含量高达 80% 的模板。本产品适用于所有 qPCR 仪器，试剂中配有 50×ROX Reference Dye，可以根据不同的仪器型号选择加入。

【产品特点】

- 1、超简操作：只需要加入引物和模板即可进行扩增。
- 2、适用性广：可较好的扩增 GC 含量高达 80% 的模板，可扩增所有物种来源的 DNA 样本，样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒等。
- 3、高效扩增：2×HRK HS SYBR Green qPCR Master Mix 含有混合的热启动聚合酶，灵敏度更高。

【储存条件】

- -20℃ ± 5℃ 避光保存，≤ 0℃ 运输。
- 试剂盒在正确储存条件下有效期为 18 个月。

【适用范围】

本试剂应用于 DNA 样本的 qPCR 扩增，可扩增所有物种来源的 DNA 样本，样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒等。

【注意事项】

- 1、产品融解后，请上下颠倒轻轻混合均匀，避免起泡，并轻微离心后使用。融解后的试剂请于冰上放置。
- 2、本产品放置时间过久后可能会有少许沉淀，请室温放置片刻并颠倒混匀后使用。
- 3、本产品中不含有实验使用的引物及模板。
- 4、反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。

【实验流程】

1、在 qPCR 管中配制如下混合液

试剂名称	使用量		
2×HRK HS SYBR Green qPCR Master Mix	10 µl	12.5 µl	25 µl
PCR Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	0.5 µl	1 µl
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	0.5 µl	1 µl
DNA 模板	1 µl	1 µl	2 µl
ddH ₂ O	8 µl	10.5 µl	21 µl
Total	20 µl	25 µl	50 µl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ◆ 模板浓度：在 20 μ l 反应体系中，DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。如模板为 cDNA 原液，建议 5-10 倍稀释，加入体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
- ◆ 引物浓度：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 - 1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
- ◆ 反应体系：推荐使用 20 μ l 或 50 μ l（等比例扩大），以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- ◆ 定量实验至少需要三个生物学重复。

2、按下列条件进行 qPCR 反应

Stage 1	预变性 ^a	Reps: 1	95°C	2 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95°C	10 sec ^b
			60°C ^c （荧光采集）	30 sec ^d
Stage 3	熔解曲线 ^e	仪器默认		

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，可根据模板类型自行减少或延长，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 5 min 以提高预变性效果。

b. 标准程序选择 10 sec，可针对实验需求自行调整。

c. 一般为 60°C，可根据引物的 T_m 值自行调整。

d. 标准程序选择 30 sec，可针对实验需求自行调整。

e. 仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

3、实验结果分析

1) 扩增曲线：

标准扩增曲线为 S 型。若 20 < Ct 值 < 30，定量分析最准确；若 Ct 值 < 10，则模板浓度太高，需要稀释后重新进行实验；30 < Ct 值 < 35，需要提高模板浓度，保证结果分析的准确性；Ct 值 > 35，检测结果无法定量分析基因的表达量，但可用于定性分析。

2) 熔解曲线：

熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析；若熔解曲线出现双峰或者多峰，则不能进行定量分析。

熔解曲线出现双峰，需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。

如果是引物二聚体，建议降低引物浓度，或者重新设计扩增效率高的引物。

如果是非特异性扩增，请提高退火温度，或者重新设计特异性更好的引物。