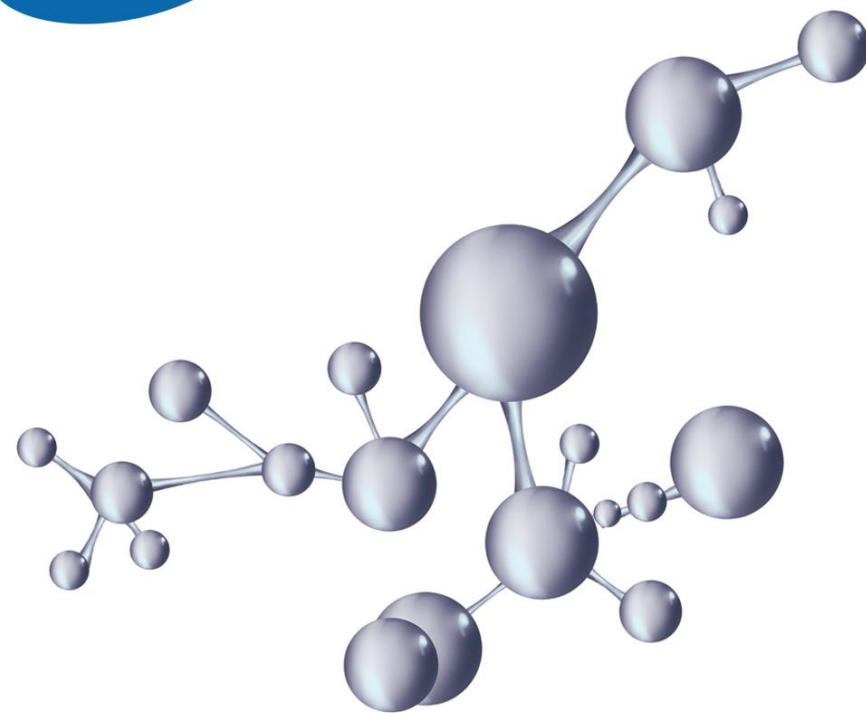




官方二维码

扫一扫 了解更多



# HRK HS Universal SYBR Green qPCR Kit

## 使用说明书

☎ 010-69738937

🌐 [www.huaruikang.com.cn](http://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](http://www.huaruikang.com.cn)

## HRK HS Universal SYBR Green qPCR Kit

### 使用说明书

#### 【目录号】

HRK-Q2402-1 (100 rxns)

HRK-Q2402-2 (500 rxns)

#### 【产品组分】

| 试剂成分                                                                | 100 rxns | 500 rxns |
|---------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| 2×HRK HS Universal SYBR Green qPCR Master Mix<br>(Low ROX Premixed) | 1 ml     | 5 ml     |

备注：本产品中预混了用以校正孔与孔之间荧光信号误差的 0.1×ROX Reference Dye，适用于无需添加 ROX Reference Dye 和 ROX Reference Dye 终浓度为 0.1×的荧光定量 PCR 仪。

#### 【适用机型】

本产品中预混了用以校正孔与孔之间荧光信号误差的 ROX Reference Dye（低浓度），适用于如下荧光定量 PCR 仪。具体见下表：

| 仪器名称                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 使用方法                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Applied Biosystems 7500, ViiA™7, QuantStudio™ instruments, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™ and Mx4000™等需要添加 Low ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪<br>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 以及一些无 ROX 校正模块的国产仪器，如宏石、博日和鲲鹏等 | 无需额外添加 ROX Reference Dye |

#### 【产品简介】

本产品是采用 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 Buffer，不仅可以提高扩增效率，同时能够高效扩增 GC 含量高达 80% 的模板。

#### 【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。

#### 【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：本产品含有混合的热启动聚合酶，灵敏度更高。

#### 【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 Universal 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 <sub>2</sub> 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 µl 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 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 - 1.0 µM 范围内调整引物浓度。
- ◆ 反应体系：推荐使用 20 µl 或 50 µl（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 <sup>a</sup>  | Reps: 1  | 95°C                     | 2 min               |
| Stage 2 | 循环反应              | Reps: 40 | 95°C                     | 10 sec <sup>b</sup> |
|         |                   |          | 60°C <sup>c</sup> (荧光采集) | 30 sec <sup>d</sup> |
| Stage 3 | 溶解曲线 <sup>e</sup> | 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<sub>m</sub> 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，溶解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认溶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  $20 < Ct \text{ 值} < 30$ ，定量分析最准确；若  $Ct \text{ 值} < 10$ ，则模板浓度太高，需要稀释后重新进行实验； $30 < Ct \text{ 值} < 35$ ，需要提高模板浓度，保证结果分析的准确性； $Ct \text{ 值} > 35$ ，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。

#### 【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、本产品放置时间过久后可能会有些许沉淀，请室温放置片刻并颠倒混匀后使用；
- 2、冻结产品融解后，请上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻微离心后使用，融解后的试剂请于冰上放置；
- 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。