官方二维码

扫一扫 了解更多

010-69738937　400-990-8785

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

HRK PROBE one step RT qPCR Kit

使用说明书

www.huaruikang.com.cn

目录
CONTENTS

1.目录号 ---------- 01

2.产品组分 ---------- 01

3.产品简介 ---------- 02

4.储存条件及有效期 ---------- 02

5.产品特点 ---------- 02

6.注意事项 ---------- 02

7.实验流程 ---------- 03

8.操作方法 ---------- 03

HRK PROBE one step RT qPCR Kit

使用说明书

【目录号】

HRK-Q2701-1（100 rxns）

HRK-Q2701-2（500 rxns）

【产品组分】

名称	100 rxns	500 rxns
HRK one step qPCR Master Mix (TaqMan probe)	1 mL	1 mL×5
HRK RT Enzyme mix	40 μL	200 μL
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，适用于以下荧光定量仪器，使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 /Step OneTM/ Step One PlusTM Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪器	使用 ROX Reference Dye 终浓度为 1×
ABI 7500、7500 Fast Real-TimePCR System 和 Aqilent Technologies 公司的 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪器	使用 ROX Reference Dye 终浓度为 0.1×

说明：

1. qPCR 实验时，在配置反应孔 mix 之前，每 1 mL mix 中加入 40 μL 50×ROX（qPCR 实验仪器型号决定加入体积）或者 50×ROX 4 μL，用 1 mL 移液器轻轻混匀。
2. 不用 Reference Dye 校正的 qPCR 扩增仪器，使用时无需添加 ROX。

【产品简介】

本产品是一款探针法 RT-qPCR 快速检测试剂盒，适用于以 RNA 为模板，进行定量 PCR 反应。在实验的过程中，逆转录和定量 PCR 在同一反应管中进行，简化了实验操作，降低了污染的风险。利用 HRK RT Enzyme mix 高效合成第一链 cDNA，并搭配使用 Taqman 探针和 HRK one step qPCR Master Mix，具有更高的扩增效率及特异灵敏度对 RNA 模板进行精确定量。

【储存条件及有效期】

1. -20℃±5℃保存，≤0℃运输；如果频繁使用，建议储存于 4℃。
2. 在正确储存条件下有效期为 18 个月。

【产品特点】

1. 应用范围广泛，能够快速、准确测定总 RNA、mRNA、RNA 病毒等样品。
2. HRK RT 酶能够耐受高温反应 50℃，反应条件能够打开 RNA 链中的复杂结构，获得完整的 cDNA 模板。
3. 使用 HRK Taq DNA polymerase 能极大程度得降低 qPCR 实验中非特异性反应。
4. one step RT qPCR Master Mix 优化系统，能够获得精准、稳定的实验数据。

【注意事项】

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请认真阅读：

1. 使用 HRK RT Enzyme mix 时，需轻微混匀，小心避免起泡，低速离心收集至管底使用。
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。
3. 溶解后的试剂请于冰上放置。
4. 本产品中不含有实验使用的引物。
5. 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. 溶解试剂，上下颠倒混匀，确认反应溶液完全溶解（避免使用振荡器混匀，剧烈振荡会降低制品性能）。
2. 配制 one step RT qPCR 反应用混合液，分装至 qPCR 反应管中。
3. 添加 one step RT qPCR 扩增用 RNA 模板。
4. 使用 Real Time PCR 扩增仪，进行 qPCR 扩增反应实验。
5. 反应液配制方法和 one step RT qPCR 扩增条件请参照使用方法。
6. Real Time PCR 仪的使用方法，请参照各种仪器说明书。
7. 本产品采用了经过化学修饰型 HRK Taq DNA Polymerase，请按照推荐的实验方法进行 Hot Start 法 PCR 扩增。

重要提示:

本产品中使用经过化学修饰 HRK Taq DNA Polymerase，与其他公司的抗体型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，90℃以下避免了副反应的产生，需要 PCR 反应前的 95℃ 2 min 酶的活性化反应。如果高温处理时间太短，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，推荐设定为 95℃ 2 min。

【操作方法】

用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT，7300/Real-Time PCR System 的操作方法。

请按照 Applied Biosystems 公司的仪器使用说明书要求进行实验操作(其它类型的荧光定量 PCR 仪器请按照说明书操作)

1. 按下列组分配制 PCR 反应液：

试剂名称	使用量		
HRK one step qPCR Master Mix	10 μL	12.5 μL	25 μL
HRK RT Enzyme Mix	0.4 μL	0.5 μL	1 μL
50×ROX Reference Dye	0.4 μL	0.5 μL	1 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
Taqman Probe(10 μM)	0.2 μL	0.2 μL	0.5 μL
RNA 模板	1 μL	1 μL	2 μL
ddH_2O(sterile distilled water)	7 μL	9.3 μL	18.5 μL
Total	20 μL	25 μL	50 μL

***备注：**

1. 在每孔反应液中 RNA 模板量小于 200 ng。

1.1. 96 孔板、Single-Tube、八连排管采用 50 μL 反应体系，384 孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate 采用 20 μL 反应体系。

2. 进行 one step qPCR 反应。

2.1. 建议采用下列显示的三步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化（如采用两步法快速扩增程序）。

Stage 1	反转录	Reps：1	42℃	30 min
Stage 2	预变性	Reps：1	95℃	2 min
Stage 3	PCR 反应	Reps：40	95℃	10 s
			60℃	30-34 s
			72℃	30 s
Stage 4	熔解曲线	仪器默认		

2.2. 退火温度根据引物来设定。使用 7700 和 7900HT 时请设定在 30 s。使用 7000 和 7300 时请设定在 31 s。使用 7500 时请设定在 34 s。

3. 实验结果分析：

反应结束后确认 one step qPCR 的扩增曲线和融解曲线，使用 qPCR 仪器分析软件进行 one step qPCR 实验结果分析。