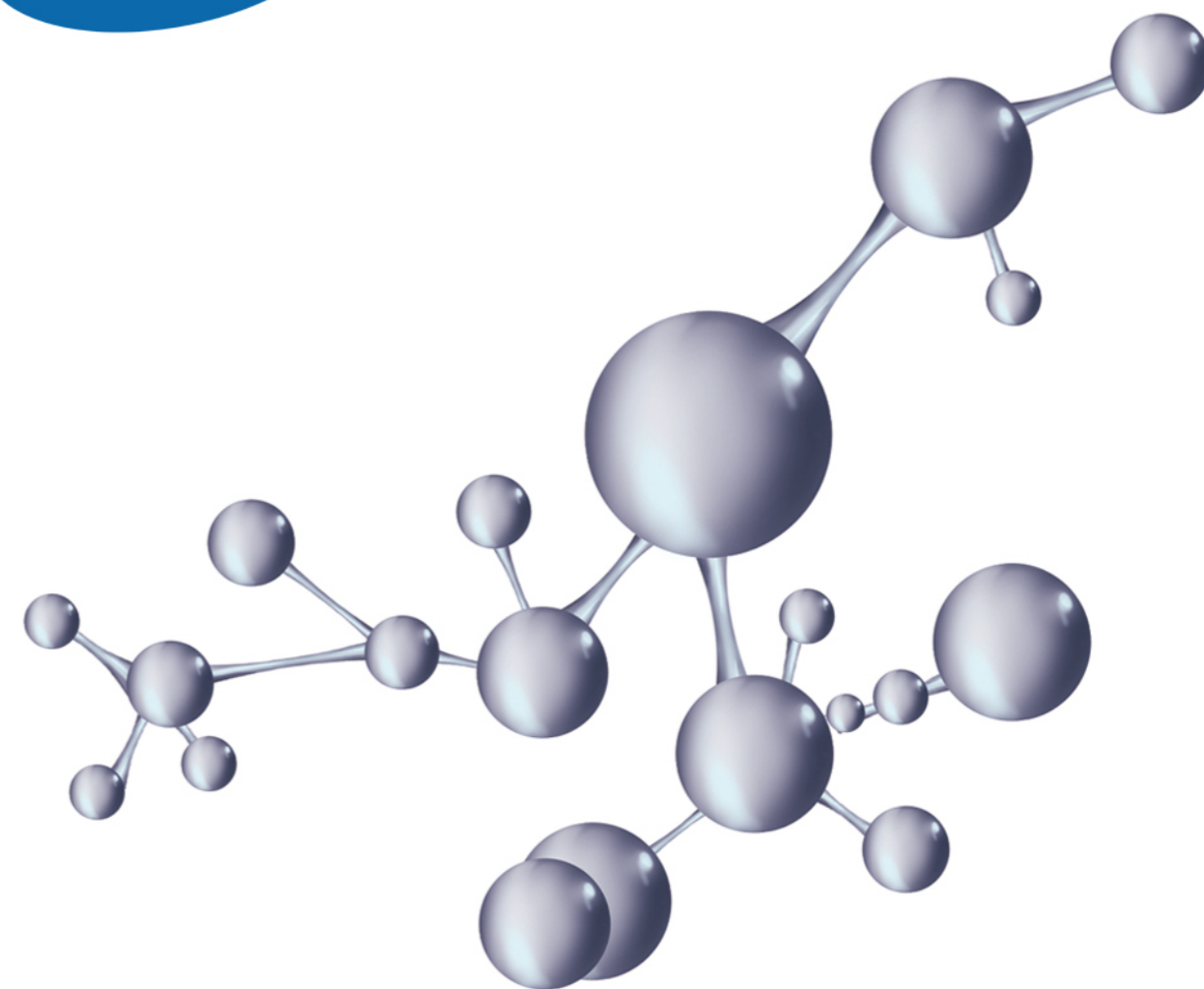




官方二维码

扫一扫 了解更多



# HRK HS SYBR Green qPCR Kit

## 使用说明书

☎ 010-69738937

🌐 [www.huaruikang.com.cn](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 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	1ml	5ml
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，使用于以下荧光定量仪器，使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700,7900HT, StepOne™, and StepOnePlus™	使用 ROX Reference Dye 终浓度为 1x
Applied Biosystems 7500, ViiA™7, QuantStudio™ instruments, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™ and Mx4000™	使用 ROX Reference Dye 终浓度为 0.1x
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,	无需添加 ROX Reference Dye

说明：

1、qPCR 实验时，在配置反应孔 mix 之前，每 1ml Mix 中加入 40 μl 50×ROX（qPCR 实验仪器型号决定加入体积）或者 4 μl 50×ROX，用 1ml 移液器轻轻混匀。

2、不用 ROX Reference Dye 校正的 qPCR 扩增仪器，使用时无需添加 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，可较好的扩增 GC 含量高达 80% 的模板。
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°C±5°C 避光保存，≤0°C 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、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。

#### 【实验流程】

- 1、在 qPCR 管中配置如下混合液

试剂名称	使用量		
	100 rxns	250 rxns	500 rxns
2×HRK HS SYBR Green qPCR Master Mix	10 μl	12.5 μl	25 μl
PCR Forward Primer (10μM)	0.5 μl	0.5 μl	1 μl
PCR Reverse Primer (10μM)	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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。
- ◆ 反应体系: 推荐使用 20  $\mu$ l 或 50  $\mu$ 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 <sup>a</sup>	Reps: 1	95°C	2min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95°C	10sec <sup>b</sup>
			60°C (荧光采集)	30sec <sup>c</sup>
Stage 3	溶解曲线 <sup>d</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; 可针对实验需求可自行调整。
- c. 标准程序选择 30 sec; 可针对实验需求可自行调整。
- d. 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 值<30, 定量分析最准确; 若 Ct<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; 35<Ct 值, 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) 溶解曲线:

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

溶解曲线出现双峰, 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, 或者重新设计更高特异性的引物。