

HRK SYBR Green qPCR Master Mix

使用说明书

产品名称	HRK SYBR Green qPCR Master Mix
HRK-2043-1	1ml
HRK-2043-5	5ml

● 储存条件

-20°C 长期保存;反复冻融不影响使用效果;如果频繁使用, 建议储存于 4°C。

● 产品简介

- 本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。产品中含有 Real Time PCR 反应的最适浓度 SYBR Green I, 进行实验时, PCR 反应液的配制十分方便简单。
- 本产品 Buffer 经过优化改良, 可以抑制非特异性反应, 能够在更广的范围内进行准确定量。
- 本产品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对目的基因进行准确定量、检测, 重复性好, 可信度高。

● 产品主要成份 (20ul 反应*500 次量)

名 称	数 量
HRK SYBR Green qPCR Master Mix	1ml x 5 支
50 x ROX Reference Dye	200ul x 1 支

备注:50 x 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
ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 /Step One™/ Step One Plus™ Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪器	使用 ROX Reference Dye 终浓度为 1x
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 0.1x

说明: 1.qPCR 实验时, 在配置反应孔 mix 之前, 每 1ml Mix 中加入 40ul 50 x ROX(gPCR 实验仪器型号决定加入体积)或者 50x ROX 4ul,用 1ml 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。

● 试剂盒特点

- ❖ 适用于各种 Real Time PCR 反应, 可以快速、准确地对目的基因进行定性、定量检测。
- ❖ 在 2x 浓度的 Master Mix 中, 预先混有 SYBR Green I, PCR 反应液配制时, 只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行 Real Time PCR 反应, 操作简单方便。
- ❖ 使用了经过化学修饰型 HRK Taq DNA Polymerase, 可以进行 Hot Start 法 PCR 反应(极大的防止副反应的发生), 再与公司精心优化的 Buffer 溶液结合使用, 具有高扩增效率、高灵敏度、高特异性的特点。
- ❖ 95°C 2min 完全热启动, 完全避免了非特异性反应的发生;

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前请认真阅读:

- ❖ 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。
- ❖ 本产品中不含有实验使用的引物。
- ❖ 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。

● Real Time PCR 操作顺序

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 PCR 反应应用混合液, 分装至 PCR 反应管中。
3. 添加 PCR 扩增用模板。
4. 使用 Real Time PCR 扩增仪, 进行 PCR 扩增反应。
5. 注)反应液配制方法和 PCR 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 Tag DNA Polymerase, 请按照推荐的实验方法进行 HotStart 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°C 以下避免了副反应的产生, 需要 PCR 反应前的 95°C 2 分钟酶的活性化反应。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°C 2 分钟。

● 操作方法

◆ 用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300 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) 按下列组份配制 PCR 反应液:

试剂名称	使用量		
HRK SYBR Green qPCR Master Mix	10ul	12.5ul	25ul
PCR Forward Primer(10μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
PCR Reverse Primer(10μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
DNA 模板	1ul	1ul	2ul
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	8.0ul	10.5ul	21ul
Total	20ul	25ul	50ul

备注:

1. 在 20ul 反应体系中, DNA 模板的添加量通常在 100ng 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。
2. 如果欲使用本产品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

- 1) 96 孔板、Sinale-Tube、8 联 Tube 采用 50 ul 反应体系, 384 孔板、96-well Fast Thermal Cyclingplate 采用 20ul 反应体系。

2) 进行 Real Time PCR 反应。

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。

三步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 2min

Stage 2: PCR 反应

95°C 10 秒

50-60°C 30~34 秒*

72°C 30 秒

40 cycles

退火温度根据引物来设定。

* 使用 7700 和 7900HT 时请设定在 30 秒。

使用 7000 和 7300 时请设定在 31 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

Stage 3: 融解曲线

95°C 1min

55°C 1min

55°C-98°C (10sec/cycle 0.5°C/cycle) 86cycles

3) 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。