

HRK SYBR one step RT qPCR Kit

使用说明书

产品名称	HRK SYBR one step RT qPCR Kit
HRK-2224-1	1ml
HRK-2224-5	5ml

● 储存条件

-20℃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℃。

● 产品简介

➤ 本产品是一款染料法 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 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。

● 产品主要成份 (20ul 反应*500 次量)

名 称	数 量
HRK one step qPCR Master Mix (SyBR Green)	1ml x 5 支
HRK RT Enzyme mix	200ul x 1 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(qPCR 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

- ❖ 应用范围广泛, 能够快速、准确测定总 RNA、mRNA、RNA 病毒等样品。
- ❖ 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。
- ❖ 使用 HRK Taq DNA polymerase 能极大程度的降低 qPCR 实验中非特异性反应。
- ❖ one step RT qPCR Master Mix 优化系统, 能够获得精准、稳定的实验数据。

● 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:

- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 溶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。

● One step RT qPCR 实验操作顺序

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 One step RT qPCR 反应混合液, 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°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/ 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) 按下列组份配制 PCR 反应液:

试剂名称	使用量		
HRK one step qPCR Master Mix(SyBR Green)	10ul	12.5ul	25ul
HRK RT Enzyme Mix	0.4ul	0.5ul	1ul
50 x ROX Reference Dye	0.4ul	0.5ul	1ul
PCR Forward Primer(10μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
PCR Reverse Primer(10μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
RNA 模板	1ul	1ul	2ul
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	7.2ul	9.5ul	19ul
Total	20ul	25ul	50ul

备注:

1) 在每孔反应液中 RNA 模板量小于 200ng。

96 孔板、Single-Tube、8 联 Tube 采用 50 ul 反应体系, 384 孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate 采用 20ul 反应体系。

2) 进行 one step qPCR 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(如果采用二部法快速扩增程序)。

三步法 one step qPCR 扩增标准程序:

RT: 42°C 30min

Stage 1: 预变性

Reps : 1

95°C 2min

Stage 2: PCR 反应

95°C 10 秒

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: 溶解曲线

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 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。