

## HelyxQuest® 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液 (ABCD)

**品名: HelyxQuest® 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液 (ABCD)**
**描述**

HelyxQuest® 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液 (ABCD) 是专为快速、高效的实时逆转录定量 PCR (RT-qPCR) 设计的试剂。在多重荧光定量反应中, 不同的引物探针组合, 由于 GC 差异/碱基组成/高级结构等因素的不同, 往往会适应不同的反应体系, 预混液的调配对获取准确可靠的结果非常重要。本产品可提供 A/B/C/D 四种精心调配的不同版本预混液, 方便用户在更换多重引物探针组合时, 找到最适合的反应体系。它能够与各种 HelyxQuest® 基因检测 Assay(引物和探针组合) 完美配合, 也可以适配其他 Taqman™ 探针引物组合的使用, 适用于 DNA 和 RNA 样本的检测。该系列预混液包含优化的逆转录酶 (M-MLV) 和热启动 DNA 聚合酶, 以及优化的缓冲液配方, 确保了在热循环过程中, 无论是 DNA 还是 RNA 靶标, 都能获得卓越的性能和灵敏度。

**试剂盒规格及存储**

| 货号         | 规格             | 反应次数 (20 $\mu$ L 反应体系) | 储存            |
|------------|----------------|------------------------|---------------|
| HB-D02081A | 0.5mL          | 100                    | -25°C ~ -15°C |
| HB-D02082A | 5mL            | 1000                   |               |
| HB-D02083A | 10mL           | 2000                   |               |
| HB-D02084A | 5 $\times$ 1mL | 1000                   |               |
| HB-D02081B | 0.5mL          | 100                    |               |
| HB-D02082B | 5mL            | 1000                   |               |
| HB-D02083B | 10mL           | 2000                   |               |
| HB-D02084B | 5 $\times$ 1mL | 1000                   |               |
| HB-D02081C | 0.5mL          | 100                    |               |
| HB-D02082C | 5mL            | 1000                   |               |
| HB-D02083C | 10mL           | 2000                   |               |
| HB-D02084C | 5 $\times$ 1mL | 1000                   |               |
| HB-D02081D | 0.5mL          | 100                    |               |
| HB-D02082D | 5mL            | 1000                   |               |
| HB-D02083D | 10mL           | 2000                   |               |
| HB-D02084D | 5 $\times$ 1mL | 1000                   |               |

**RT-PCR 准备工作**

1. 请将 HelyxQuest® 基因表达 Assay (20X) 解冻。  
**注意:** 其他来源的 TaqMan™ 探针和引物混合液, 确保其最终浓度达到 20X. 建议使用引物终浓度 400-900 nM, 探针终浓度 100-250 nM.
2. 对于 60X Assay:  
 需要用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 将 60X Assay 稀释到 20X 工作 Assay, 然后将溶液分成较小的等份, 以最大限度地减少冻融次数。等份的大小取决于通常运行的 PCR 反应的数量。下表显示了一个稀释示例。
  - a) 轻轻涡旋 60X Assay 的存储管, 然后瞬时离心, 消除气泡。

b) 在一个1.5mL的微量离心管中，稀释足够量的60X Assay，以达到所需的反应次数。

| 成分                          | 体积          |
|-----------------------------|-------------|
| HelyxQuest®基因表达 Assay (60X) | 40 $\mu$ L  |
| TE, pH 8.0 (1X)             | 80 $\mu$ L  |
| 总量                          | 120 $\mu$ L |

c) 将分装管子保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  直到使用。

### 配制反应体系

- 将各组分置于冰上解冻，轻轻颠倒混匀后进行离心，再放回冰上备用。  
**注意：**HelyxQuest® 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液的浓度为 4 $\times$ ，比常见预混液粘稠，因此在操作前请确保所有组分都已充分混匀。
- 根据下表将各组分加入反应板中。在配制多个反应孔时，请为各组分预留 10% 的余量，以补偿移液过程中可能出现的体积损失。

| 成分  | 用量/反应孔          |                |   |
|---|-----------------|----------------|---|
|   | 20 $\mu$ L 体系   | 50 $\mu$ L 体系  | 备注  |
| HelyxQuest 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液 (4X) | 5 $\mu$ L       | 12.5 $\mu$ L   | N/A   |
| HelyxQuest 基因表达 Assay (20X)<br>或其他来源 TaqMan Assay | 1 $\mu$ L       | 2.5 $\mu$ L    | N/A   |
| 样品 (DNA/RNA)                                      | x               | y              | 可根据需要加入尽可能多的样品。<br>x 最大为 14 $\mu$ L, y 最大为 35 $\mu$ L |
| RT-PCR Grade Water                                | (14- x) $\mu$ L | (35-y) $\mu$ L | N/A   |
| 反应总体积   | 20 $\mu$ L      | 50 $\mu$ L     | N/A   |

- 用光学贴膜封住反应板。
- 短暂离心反应板，使反应液聚集在孔底。

### 设置并运行荧光定量 PCR 仪器

请参阅所使用仪器的使用说明，以获得热循环条件以及反应耗材的详细说明。HelyxQuest® 1-Step Fast Multiplex RT-qPCR 预混液适配快速和标准热循环模块。

注意：所使用的耗材（8联管，96孔反应板，384孔反应板等）需要和仪器加热模块匹配。

#### 1. 快速反应热循环程序

| 热循环程序     | 温度                    | 时间            | 循环次数 |
|-----------|-----------------------|---------------|------|
| 逆转录       | 50 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min         | 1    |
| 逆转录终止/预变性 | 95 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min         | 1    |
| 扩增-变性     | 95 $^{\circ}\text{C}$ | 3 sec         | 40   |
| 扩增-退火/延伸  | 60 $^{\circ}\text{C}$ | 30 sec (读取荧光) |      |

## 2. 标准反应热循环程序

| 步骤        | 温度   | 时间            | 循环次数 |
|-----------|------|---------------|------|
| 逆转录       | 50°C | 5 min         | 1    |
| 逆转录终止/预变性 | 95°C | 5 min         | 1    |
| 扩增-变性     | 95°C | 15 sec        | 40   |
| 扩增-退火/延伸  | 60°C | 60 sec (读取荧光) |      |

## 结果分析

请参阅所使用仪器或者软件的使用说明，进行数据分析的相关操作，使用绝对或相对定量( $\Delta\Delta Ct$ ) 方法来分析结果。数据分析的一般步骤包括

1. 查看反应孔的扩增曲线，如果有必要：
  - 调整基线期和阈值。
  - 删除异常反应孔值。
2. 在反应板的结果数据表中，查看每个反应孔和每个重复组的Ct值。

## 良好操作规范 (qPCR)

荧光定量 PCR 可以检测到微量的 DNA，需要采取预防措施以避免污染尚未扩增的样本。

任何时候都要戴手套并经常更换。不使用时请关闭样品管。小心操作样品管和试剂，以限制气溶胶的扩散。

- 戴上干净的手套，穿上干净的实验服。操作扩增产物或准备样品时，不要戴以前使用过的手套。
- 如果怀疑手套被污染，请更换手套。
- 保持专用的区域和专用的设备及用品：
  - 样品制备和试剂配制。
  - 产物的扩增和分析。
- 不要将扩增产物带入反应体系配制区域。
- 小心地打开和关闭所有的样品管，避免样品飞溅。
- 尽可能保持试剂管和反应管盖上盖子。
- 使用外置活塞式移液器或带滤芯的移液器吸头。
- 定期用10%的漂白剂或DNA去污液清洁实验室工作台和设备
- 扩增后不要打开样品管盖。
- 在进行阴性对照、未知样品和阳性参考品的移液时，使用不同的移液器。

仅供研究使用,不用于临床诊断

©2024 苏州海博赛思生物科技有限公司，版权所有，保留所有权利。 HelyxQuest®属于苏州海博赛思生物科技注册商标；Taqman®属于 Roche Diagnostics GmbH.注册商标；

版本.A.01