

RAPA3G Probe qPCR MasterMix (with UDG) 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述：

RAPA3G Probe qPCR MasterMix 将热启动 RAPA3GDNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTP 染料等试剂预混在一起，是一种 2× 浓度的单组分预混试剂。该制品不含有 ROX 校正染料，适用于各种荧光标记探针，并且适用于各种定量 PCR 机型。优化的反应缓冲液，使得该制品可用于单重及多重的探针法定量 PCR。

制品中的 RAPA3G DNA 聚合酶为第三代 DNA 聚合酶，其具有最高的杂质耐受性，其对乙醇、胍盐、肝素、血清、植物多糖多酚具有极高的耐受性，因此可用于粗样品的直接定量 PCR 检测 (Direct PCR)。该酶经化学法修饰，在 50℃ 以下 100% 无活性，只有 95 度条件下加热 5min 后才能完全恢复酶的活力。因此该系统可以有效抑制非特异性 PCR 扩增，极大的提高了 PCR 扩增特异性。

由于 RAPA3G DNA 聚合酶对 dUTP 具有极强的识别能力，该制品中的 dTTP 核酸碱基完全被 dUTP 所取代，因此扩增产物均包含 dUTP，在配合热敏 UDG（该酶在 95℃ 热变性 5min 后不可逆失活，不影响后续 PCR 反应）的条件下能达到最佳的防污染能力。在 10e5 copies 污染物的测试条件下，Ct 推迟 15 个以上（污染去除能力 >99.997%）。

包装

2×RAPA3G Probe MasterMix (with UDG)
1 ml
25 ml

储存： -20℃ 可保存 2 年。短期使用可放置 2-8℃，保存 3 个月。如出现白色沉淀溶解后使用，不影响反应性能。该试剂经 30 次冻融后性能无下降，因此不使用时请置于 -20℃ 避光保存。

RAPA3G DNA 聚合酶对抑制物耐受性

SDS	0.01%	Serum	2%
EtOH	5%	Plasma Citrate	2%
Heparin	0.1IU/ml	Gua SCN	0.25%
Hematin	30μM	Trizol	0.5%

操作方法

1、按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系：

		终浓度
2×RAPA3G Probe MasterMix(with UDG)	10 μl	1×
Primer F1 (20 μM)	0.1-0.4 μl	0.1-0.4 μM
Primer R1 (20 μM)	0.1-0.4 μl	0.1-0.4 μM
Probe1 (20 μM)	0.1-0.4 μl	0.1-0.4 μM
其它引物和探针		X
DNA 模板	0.5~2 μl	
ddH ₂ O	Up to 20 μl	

2. 进行 Real-Time PCR 反应,通常采用两步法,程序如下:

Stage 1	25℃	2 min	去污染
Stage 2	95℃	5 min	热启动
Stage 3	95℃	5 s	变性
40 循环	60℃	30 s	收集信号 退火/延伸

注意：退火延伸温度可在 55-65℃调整

3. 在多数情况下,采用两步法程序可获得理想的扩增效果,在无法达到预期理想效果的情况下,也可采用三步法 PCR 程序,程序如下:

Stage 1	25℃	2 min	去污染
Stage 2	95℃	5 min	热启动
Stage 3	95℃	5 s	变性
	55℃	10 s	退火
40 循环	72℃	30 s	收集信号 延伸

4. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线和标准曲线。R Gre