

RAPA3G SYBR Green qPCR Mix 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

本产品是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用试剂，本 SYBR Green qPCR Mix 将化学修饰的热启动 RAPA3G DNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTP、SYBR Green 染料等试剂预混在一起，是一种 2×浓度的单组分预混试剂。该制品配有单独的 ROX 内参染料，可用于需要 ROX 进行孔间校正的定量 PCR 仪。RAPA3G DNA 聚合酶为第三代 DNA 聚合酶，其具有最高的杂质耐受性（对乙醇、胍盐、肝素具有极高的耐受性），因此对于纯度较差的 DNA 模板，该 Mix 仍然可以获得理想的实验结果。

RAPA3G DNA 聚合酶为化学法修饰的 HotStart 版本，其在 50℃以下 100%无活性，只有 95℃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。该试剂盒独特的反应缓冲液，可在宽范围中得到良好的扩增结果、检测灵敏度更高、信号更强。

包装

2×RAPA3G SYBR Green qPCR Mix	50×ROX Dye
1 ml	200 µl
1 ml×5	200 µl

储存: 请避光置于-20℃以下可保存 3 年。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。

操作方法

1. 根据机型选择步骤 A 或 B

A: 需要添加 ROX 染料进行反应孔间信号校正的 Real-TimePCR 仪,包括 ABI PRISM7900HT, 7300/7500/7500 FastReal-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P(Stratagene)等。按照如下组分配制 20 µl PCR 反应体系:

	终浓度	
2×RAPA3G SYBR Green qPCR Mix	10 μl	1×
50×ROX Reference Dye	0.4 μl	1×
PCR Forward Primer(10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
DNA 模板	0.5~2 μl	
ddH ₂ O	Up to 20 μl	

注意：引物用量有时可提高到 0.8 μl 以提高扩增效率。

B: 无需添加 ROX 染料进行反应孔间信号矫正的 Real-Time PCR 仪，包括：LightCycler (Roche Diagnostics)；CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad & MJ)；Line-Gene (Bioer, 杭州博日) 等。按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系：

	终浓度	
2×RAPA3G SYBR Green qPCR Mix	10 μl	1×
PCR Forward Primer(10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
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:	95°C	5min*	
Stage 2:	95°C	10s	
	60°C	20s	40 cycles

Stage 3: Dissociation analysis

注意：由于该酶为化学修饰的热启动 RAPA3G DNA 聚合酶，必须于 95°C 加热 5min 才能恢复酶的活性，该热启动步骤不能缩短时间。

3. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。