

描述: 本制品为冻干瓶形式的预混试剂, 便于稳定运输、保存。是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用试剂。制品中包括化学修饰的热启动 3G-Taq DNA 聚合酶(100%热启动)、反应 Buffer、dNTP、SYBR Green 染料和冻干赋形剂 (不含 ROX 染料)。

3G-Taq 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°C 以下 100%无活性, 只有 95°C 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。

组分

名 称	100Tx20μl	500Tx20μl
Lyo-Chemi3G SGreen Reagent	1 瓶	1 瓶 x5
10%甘油	1.5 ml	1.5 ml x2

注意:

- (1) 冻干制品未溶解状态下: 37°C 下运输 (1 个月有效), 25°C 室温 (1 年有效), 长期保存请置于-20°C 以下 (5 年有效)。每瓶用 0.45 ml 10%甘油溶解后, 为 4x 浓度, 干物质占 0.05 ml 体积。该 4xMix 在-20°C 保存 (6 个月有效)。
- (2) 3GTaq 酶为化学修饰的热启动酶, 必须于 95°C 加热 5min 才能恢复酶的活性, 不能随意缩短时间。
- (3) 每瓶该制品含有 50U 的 Chemi 3GTaq 聚合酶。制品中不含 ROX 染料, 必要时可自行添加。

操作方法

1. 按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系:

	1x浓度
4xChemi3G SGreen Mix	5 μl
Primer F (10 μM)	0.8 μl 400 nM
Primer R (10 μM)	0.8 μl 400 nM
模板 DNA	10 ng
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	5 min	热启动
Stage 2	95°C	10 s	变性
循环 40	55~60°C	20 s	收集信号 退火/延伸
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。

注意:

- (1) 引物的使用浓度: 通常为 400 nM。如扩增效率较低, 可提高至 800 nM, 如扩增非特异性严重, 可降低到 200 nM。
- (2) 如扩增效率较低可降低时, 延伸温度可调整到 55°C 延伸 20s。或采用三步法 40x (95°C 10s, 55°C 10s, 72°C 20s)。
- (3) 如非特异性扩增较严重时, 延伸温度可调整到 65-68°C 延伸 20s。