

描述: RAPA3G MultiPlex Probe qPCR Mix 将热启动 RAPA3G DNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTP 染料等试剂预混在一起, 是一种 2x 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, 使得该制品不仅可用于单重的探针法定量 PCR, 还允许进行多重定量 PCR (MultiPlex qPCR) 检测, 该制品可进行 4 重以上的定量 PCR 检测。

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。

包装

2xRAPA3G MultiPlex Probe qPCR Mix	
A2260A	1 ml
A2260B	1 ml x 5
A2260C	25 ml

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。

RAPA3G DNA 聚合酶对抑制物耐受性

SDS	0.01%	Serum	2%
EtOH	5%	Plasma Citrate	2%
Heparin	0.1 IU/ml	Gua SCN	0.25%
Hematin	30 μM	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
2xRAPA3G MultiPlex Probe qPCR Mix	10 μl	1x
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	

关于引物和探针的使用说明:(1)在进行单重 qPCR 检测时, 通常引物和探针用量在 0.2 μl (0.2 μM) 时一般具有较高的效果。(2)在进行多重定量 PCR 时, 通常首先进行单重检测, 通过单重检测结果来评估引物和探针的效率、特异性等情况后, 再进行引物、探针组合进行多重检测。

2. 进行 Real-Time PCR 反应,通常采用两步法, 程序如下:

Stage 1	95℃	5 min		热启动
Stage 2	95℃	5 s		变性
循环 40 次	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	95℃	5 min		热启动
Stage 2	95℃	5 s		变性
	55℃	10 s		退火
循环 40 次	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。