

**描述:** RAPA3G Probe qPCR MasterMix 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°C 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°C 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

2xRAPA3G Probe MasterMix (with UDG)	
A2262A	1 ml
A2262B	25 ml

**储存:** -20°C 可保存 2 年。短期使用可放置 2-8°C, 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°C 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
2xRAPA3G Probe MasterMix(with UDG)	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 <sub>2</sub> 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°C	2 min	去污染
Stage 2	95°C	5 min	热启动
Stage 3	95°C	5 s	变性
40 循环	60°C	30 s	收集信号 退火/延伸

注意: 退火延伸温度可在 55-65°C 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°C	2 min	去污染
Stage 2	95°C	5 min	热启动
Stage 3	95°C	5 s	变性
	55°C	10 s	退火
40 循环	72°C	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。

**注意:** 消化污染步骤中的温度设置可在 25-37°C 之间均可, 无显著差异, 但高于 42°C 以上的温度会导致热敏 UDG 消化能力急剧下降。