

描述：本制品是采用 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

规格	2×RAPA3G SYBR Green qPCR Mix	50×ROX Dye
1ml (A2250A)	1 ml	200 μl
5ml (A2250B)	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-Time PCR 仪，包括：ABI PRISM7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-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校正的 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℃	5min*
Stage 2:	95℃	10s
	60℃	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℃ 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。