

**描述:** 本制品是采用 TaqMan 探针法进行 Real-Time PCR 的专用试剂, 其包含化学修饰的热启动 3G-Taq DNA 聚合酶 (100%热启动)、反应 Buffer、dA/C/G/UTP(不含 dTTP)、以及稳定剂, 是一种 5x浓度的单组分预混试剂 (不含 ROX)。优化的反应缓冲液, 使得该制品可用于 1~4 重的探针法定量 PCR。

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。

#### 组分

名 称	100Tx20μl	500Tx20μl
5xdU-Chemi3G-qPCR Mix	400 μl	400 μl x5

**注意:** (1) 5xChemi3G-qPCR Mix 溶化时可能会有白色结晶, 必要时可于 30°C下放置 2-5min 使结晶体溶解。

(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) 1x 浓度下含有 1.5%海藻糖、2%甘露醇、25mU/μl 的 Chemi 3GTaq、该制品不含甘油, 可用于冻干制品生产。

(4) 避光保存: -20°C可保存 2 年。

(5) 该制品中不含 dTTP, 防污染 PCR 时, 建议热敏 UDG 的使用浓度为 1x 下 10mU/μl。

#### 操作方法

##### 1. 按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系

	1x浓度
5xChemi3G-Probe Mix	4 μl
Primer F1 (10 μM)	0.8 μl 400 nM
Primer R1 (10 μM)	0.8 μl 400 nM
Probe1 (10 μM)	0.4 μl 200 nM
其它引物和探针	x μl
模板 DNA	10 ng
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	95°C	5 min	热启动
Stage 2	95°C	10 s	变性
循环 40 次	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

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. 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°C	5 min	热启动
Stage 2	95°C	10 s	变性
	55°C	10 s	退火
循环 40 次	68°C	30 s	收集信号 延伸