

描述: Chemi3G DNA Reagent 为冻干瓶形式的预混试剂, 其包含化学封闭热启动 3GTaq DNA 聚合酶、反应 Buffer、dA/C/G/UTP(不含 dTTP)、以及稳定剂, 不含 ROX。优化的反应体系, 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, 该试剂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
Lyo-Chemi3G 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 40 mg 海藻糖, 50 mg 甘露醇, 50U 的 Chemi 3GTaq 聚合酶。

(4) 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
4xChemi3G Mix	5 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/RNA	10 ng
ddH2O 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