

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 简明操作指导

注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见

适用产品目录号：A6101, A6102

www.promega.com/protocols/

I. 说明：GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 专门针对水解探针形式的实时定量 PCR 实验进行了优化，检测灵敏，可在室温进行操作，并且对多种 PCR 抑制剂具有很好的耐受性。

II. 产品组分：本试剂以稳定的即用型 2X 混液形式提供，含有 GoTaq[®] 热启动聚合酶，并且包含除模板、引物和探针外所有用于实时定量 PCR 的组分。CXR 参比染料未加入预混液中，而采用单管独立包装，方便使用者根据仪器和实验需求单独添加。产品组分、包装量及储存条件见下表：

产品	A6101 200 次反应	A6102 1000 次反应	储存条件
GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix, 2X	2 × 1ml	10 × 1ml	将所有组分储存于 -30℃ 到 -10℃ 之间，避光保存。短期储存或经常使用时，预混液可在 2-8℃ 条件下避光储存 3 个月。预混液解冻后要混匀使用，混匀时动作要温和，避免产生气泡。
CXR Reference Dye, 30μM	100μl	2 × 200μl	
Nuclease-Free Water	2 × 1.25ml	13ml	

III. 操作步骤

需用户自备的设备和材料：

- 实时定量 PCR 仪和相关设备
- 无菌带滤芯吸头
- 扩增前专用移液器
- DNA 模板
- qPCR 引物及探针

1. 根据仪器类型和实验需求将 CXR 参比染料添加到 2X 预混液中（可选）

- 1) Bio- Rad、Roche 及 Eppendorf 等品牌仪器无需添加参比染料。
- 2) 针对其他仪器推荐的 CXR 参比染料浓度及添加方式如下：
ABI 7500 和 7500 FAST、QuantStudio[®]、ViiA[®] 7 及 Stratagene/Agilent 等品牌仪器需要加入较低浓度（30nM）的参比染料。
ABI 的 StepOne[™]、StepOnePlus[™]、7300、7900HT 等仪器需要加入较高浓度（500nM）的参比染料。

有关将参比染料加入 2X 预混液的操作方法的详细信息，请参阅 GoTaq[®] Probe qPCR System 技术手册 # TM378，第 4.A 部分。

2. GoTaq[®] Probe qPCR 反应体系的配制：

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 使用热启动 DNA 聚合酶，因此可在室温配制反应液。

- 1) 融化 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 和 Nuclease-Free Water。不要在高于室温条件下解冻 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix。

- 2) 将 GoTaq® Probe qPCR Master Mix 涡旋振荡 3-5 秒。
- 3) 确定需要准备的反应次数，包括阴性对照。在实际需要的反应次数基础上增加 1-2 次反应，以补偿移液造成的损失。
- 4) 按下表配制反应混合液（不加 DNA 模板）。DNA 模板在第 6) 步添加。短暂涡旋混合。

组分	体积	终浓度
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X	10µl	1X
上游引物 (20 X)	1µl	200nM–1µM
下游引物 (20 X)	1µl	200nM–1µM
水解探针 (20X)	1µl	100–300nM
DNA 模板	2–5µl	≤250ng
Nuclease-Free Water	补至终体积为 20µl	

- 5) 将反应混合液（不含 DNA 模板）加入到 PCR 反应管或 PCR 板孔中。
- 6) 将 DNA 模板加入反应板的对应孔中。将水加入无模板对照反应孔中。
- 7) 密封反应管或 PCR 板，并短暂离心使液体富集于管底。避免光照或高温。此时样品已准备好进行热循环。

3. 循环条件

下面提供的循环参数可作为指南，用户可根据需要进行优化以获得最佳结果。

标准循环条件：

步骤	循环	温度	时间
GoTaq® DNA Polymerase 激活	1	95°C	2 分钟
变性	40	95°C	15 秒
退火和延伸		60°C	1 分钟

快速循环条件：

步骤	循环	温度	时间
GoTaq® DNA Polymerase 激活	1	95°C	2 分钟
变性	40	95°C	3 秒
退火和延伸		60°C	30 秒