

注意：这是简明操作步骤，详细英文说明书请从下面链接下载：

<http://www.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>

目录号	规格
M7121	10个反应
M7122	100个反应
M7123	1,000个反应

包含有 GoTaq® Green Master Mix, 2X 和无核酸酶的水。

描述： GoTaq® Green Master Mix是预先混合的、即用型溶液，含有来源于细菌的GoTaq® DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂ 和反应缓冲液，这些组分均为最佳浓度，用以通过PCR反应对DNA模板进行有效扩增。GoTaq® Green Master Mix 含有两种染料(蓝色和黄色)，在电泳时分离，便于监测电泳的进程。使用GoTaq® Master Mix组装的反应具有足够的密度，可以直接加样到琼脂糖凝胶上。

如果PCR扩增反应后用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色来分析，那么推荐使用GoTaq® Green Master Mix。如果扩增后下游应用需检测吸光值或者进行荧光激发，那么不推荐使用GoTaq® Green Master Mix，因为预混液中的染料可能会干扰这些应用。GoTaq® Green Master Mix中的染料在225-300nm有吸收，使测定DNA浓度的A260读数不可靠。这些染料在488nm以及600-700nm之间有激发峰，与荧光检测仪器中常用的激发波长有重合。然而，对一些仪器（如：使用488nm激发波长的荧光胶扫描仪）来说，这种干扰极小。原因是：在488nm波长有吸收的是黄色染料，而黄色染料比引物（<50bp）迁移得快，所以胶经扫描后会在引物下面有浅灰的染料前沿。

GoTaq® Green Master Mix, 2X: 含有GoTaq® DNA聚合酶、2X绿色GoTaq® 反应缓冲液 (pH 8.5)、400μM dATP、400μM dGTP、400μM dCTP、400μM dTTP和 3mM MgCl₂。绿色GoTaq® 反应缓冲液使用专利的配方，其中含有能够增加样品密度的化合物以及黄色和蓝色的染料（当用琼脂糖凝胶电泳分析反应产物时可作为上样染料）。在1%的琼脂糖凝胶中，蓝色染料与3–5kb DNA片段的迁移速度相同。黄色染料比引物（<50bp）迁移得快。

储存条件： 关于储存条件的建议见产品标签。为避免反复冻融可以分装保存。使用前注意混匀。

I. 标准应用

请使用者准备：

- 模板 DNA
- 上游引物
- 下游引物
- 矿物油（可选）

1. 室温融化GoTaq® Green Master Mix。涡旋振荡混合Master Mix，然后短暂离心使内容物集中于管底。
2. 在无菌无核酸酶的离心管中，按照下列体系之一组建反应，在冰上操作：

25μl 反应体系：

组分	体积	终浓度
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5μl	1X
上游引物, 10μM	0.25–2.5μl	0.1–1.0μM
下游引物, 10μM	0.25–2.5μl	0.1–1.0μM
模板 DNA	1–5μl	<250ng
无核酸酶水补足终体积	25μl	



GoTaq® Green Master Mix 简明操作步骤

Promega

50µl 反应体系:

组分	体积	终浓度
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25µl	1X
上游引物, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
下游引物, 10µM	0.5–5.0µl	0.1–1.0µM
模板 DNA	1–5µl	<250ng
无核酸酶水补至终体积	50µl	

100µl 反应体系:

组分	体积	终浓度
GoTaq® Green Master Mix, 2X	50µl	1X
上游引物, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
下游引物, 10µM	1.0–10.0µl	0.1–1.0µM
模板 DNA	1–5µl	<250ng
无核酸酶水补至终体积	100µl	

- 如果仪器要求, 则在反应混合物上加 1 到2 滴 (约50µl) 矿物油, 以防止热循环中的蒸发。将反应混合物离心5秒钟。
- 将反应放进已预热至95°C的PCR仪里, 按照您的标准参数进行PCR循环反应。

II. PCR扩增的一般性指南

A. 变性

- 通常, 95°C, 2 分钟的初始变性就足够了。
- 后续的变性步骤在30秒到1分钟之间。

B. 退火

- 退火温度的优化可以从引物的 $T_m-5^\circ\text{C}$ 起始, 以 1°C 为间隔逐步增加退火温度。
- 退火步骤一般为30秒到1分钟。

C. 延伸

- 延伸反应一般在Taq酶的最适温度进行, 即72-74°C。
- 延伸时间至少为1 分钟/kb。
- 推荐在72-74°C最后延伸5分钟。

D. 冷却

- 如果热循环仪有冷却或“soak”的循环, 那么可将循环反应设置成将反应管在4°C放置几个小时结束。
- 该循环可以最大程度减少可能在更高温度时出现的聚合酶活性 (尽管这通常不是个问题)。

E. 循环数

- 一般来说, 25-30个循环可获得目的产物的最佳扩增。
- 有时可能需要进行更多循环的扩增 (最多40个循环), 例如, 检测低拷贝的靶标时。