



中文操作手册

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix

Cat. # A6101, A6102



www.promega.com

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/tbs 网站获得。请访问该网址以确定您所使用的技术手册是否为最新版本。如果您在使用本试剂盒的过程中有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。电子邮件：chinatechserv@promega.com

目录

1. 产品描述	2
2. 产品组分和储存条件	3
3. 一般注意事项	4
3.A 防止污染	4
3.B 定量 PCR 引物和探针	4
3.C 基因组 DNA	4
3.D CXR 校正染料	4
3.E 需要较低浓度（30nM）校正染料的仪器	5
3.F 需要较高浓度（500nM）校正染料的仪器	5
4. 探针法定量 PCR 操作步骤	5
4.A 将 CXR 校正染料加入 GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix 中（可选）	5
4.B 准备扩增	6
5. 热循环程序	7
6. 引用文献	7

1. 产品描述

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 是优化的用于探针法定量 PCR 的专用试剂。本产品提供易用的 2× 预混液，已包含用于定量 PCR 的所有组分（模板、引物和探针除外）。预混液中不含校正染料，100× 的 CXR（carboxy-X-rhodamine）校正染料单独提供。使用者可根据仪器的需要添加。

即使在多种 PCR 抑制因子存在条件下，GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 仍有优异表现。其配方中采用抗体介导的热启动酶，反应体系的配制可在室温完成。本试剂所采用的 Taq 酶具有快速激活与快速合成的优点，可同时兼容标准 PCR 程序和快速 PCR 程序。

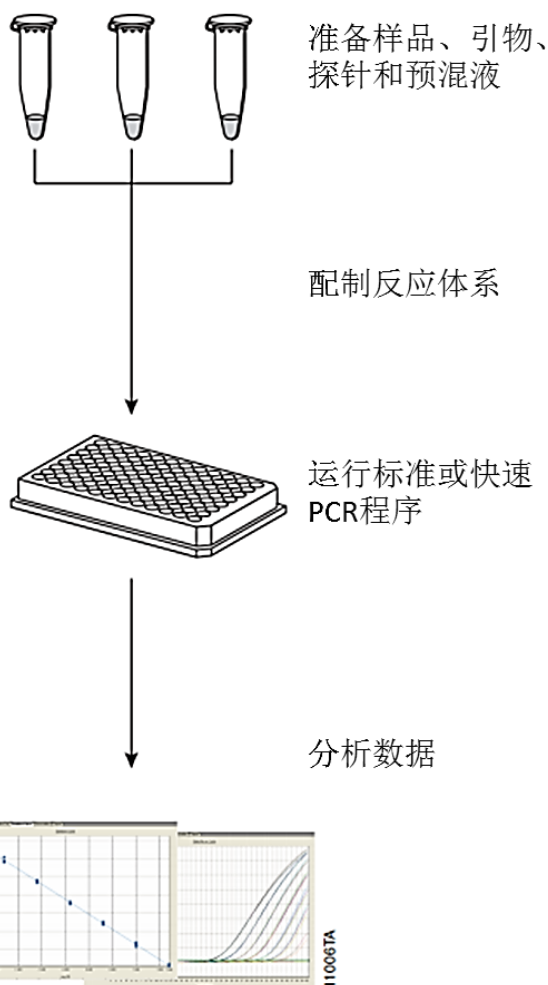


图 1. GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 操作流程。

2. 产品组分和储存条件

产品	包装	货号
GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix	200 反应	A6101

本产品仅供研究用，不用于诊断。包含的试剂足够用于 200 个 20 μ l 体系的反应。试剂盒中包括：

- 2 \times 1ml GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix, dTTP (2X)
- 100 μ l CXR Reference Dye, 30 μ M
- 2 \times 1.25ml Nuclease-Free Water

产品	包装	货号
GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix	1000 反应	A6102

本产品仅供研究用，不用于诊断。包含的试剂足够用于 1000 个 20 μ l 体系的反应。试剂盒中包括：

- 10 \times 1ml GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix, dTTP (2X)
- 2 \times 200 μ l CXR Reference Dye, 30 μ M
- 13ml Nuclease-Free Water

其他相关产品：

产品	包装	货号
GoTaq [®] 1-Step RT-qPCR System*	200 反应	A6120
GoTaq [®] 2-Step RT-qPCR System*	200 反应	A6110
Nuclease-Free Water**	50ml	P1193

*本产品仅供研究用，不用于诊断。 **仅用于实验室。

储存条件：所有组分储存于-30℃到-10℃。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，避免产生大量气泡。

3. 一般注意事项

3.A 防止污染

- 扩增前和扩增后的步骤要使用专用的区域和移液器进行以最大限度的减少 PCR 产物对样品的污染；
- 戴手套操作并经常更换；
- PCR 反应完成后不要打开反应管！打开反应管会增加产物污染下次反应的几率；
- 使用带滤芯枪头可防止污染。

3.B 定量 PCR 引物和探针

每一组引物和探针的组合都要通过预实验优化其浓度比例。通常情况下，初次实验时，采用 900nM 的引物浓度和 250nM 的探针浓度能得到较好的结果。PCR 引物的浓度可在 200nM-1 μ M 范围内优化，探针浓度可在 100nM-300nM 范围内优化。必要时，可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。

浓度优化好后，可将引物和探针按照优化的浓度配制成 20 \times 储存液，以方便后续的操作。

3.C 基因组 DNA

使用基因组 DNA 为模板时，建议 DNA 的用量 \leq 250ng。

3.D CXR 校正染料

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 中不含校正染料。校正染料在试剂盒中单独提供，以方便实验者根据自己仪器的需要进行调整。加入校正染料进行校正后可能会使 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 的表现更佳。CXR 校正染料与常用的 ROX 校正染料拥有相同的激发和发射波长，在仪器上采用相同的设置。试剂盒中提供的校正染料储存液浓度为 30 μ M。

某些仪器需要较低浓度的 ROX 染料进行校正，我们建议加入终浓度 30nM 的 CXR 染料。其他需要较高浓度 ROX 校正染料的仪器，我们建议加入终浓度 500nM 的 CXR 校正染料。

需要低浓度或高浓度校正染料的仪器见 3.E 和 3.F 的列表。每一类仪器配置 PCR 反应体系的方法见第 4 部分。

3.E 需要较低浓度（30nM）校正染料的仪器

- Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR System
- Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System
- Bio-Rad DNA Engine Opticon® and Opticon® 2 Real Time PCR Detection Systems
- Bio-Rad/MJ Research Chromo4™ Real-Time Detector
- Cepheid SmartCycler® system
- Corbett Rotor-Gene™ 3000 and 6000 Real-Time Rotary Analyzer
- Eppendorf Mastercycler® ep realplex Real-Time PCR System
- Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System
- Stratagene Mx3000P® and Mx3005P® Real-Time PCR Systems
- Stratagene Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System

3.F 需要较高浓度（500nM）校正染料的仪器

- Applied Biosystems ABI PRISM® 7000 and 7700 Sequence Detection System
- Applied Biosystems 7300 and 7900HT Real-Time PCR System
- Applied Biosystems GeneAmp® 5700 Thermal Cycler
- Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

4. 探针法定量 PCR 操作步骤

由研究者提供的材料：

- 荧光定量 PCR 仪器及相关设备（如配套的 PCR 反应板及盖子等）
- 无菌、带滤芯的枪头
- 专用的移液器
- DNA 模板
- qPCR 引物和探针

4.A 将 CXR 校正染料加入 GoTaq® Probe qPCR Master Mix 中（可选）

需要向扩增体系中加入 CXR 校正染料时，建议将 CXR 染料直接加入 1 ml 的 GoTaq® Probe qPCR Master Mix 管中。使用不同仪器时，加入 CXR 的量也不同（请参照第 3 部分来确定您的仪器需要低浓度 CXR 还是高浓度 CXR）：

1. 将 GoTaq® Probe qPCR Master Mix 置于室温融化（勿高于室温）；
2. 颠倒数次或吹打预混液 3-5 次以混匀；

- 向 1ml 的 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 中加入 CXR 校正染料：

需要低浓度校正染料的仪器：取 2 μl CXR 溶液（30 μM）加入 1 ml 的预混液中。

需要高浓度校正染料的仪器：取 17 μl CXR 溶液（30 μM）加入 1 ml 的预混液中。
- 颠倒数次或吹打预混液 3-5 次以混匀；
- 已加入 CXR 的 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 要标记好，防止重复添加。已添加 CXR 的预混液仍旧储存于-20℃。

4.B 配制扩增体系

GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 是采用热启动法的扩增试剂，因此反应液的配制可在室温完成。

- 将 GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix 和无核酸酶的水置于室温融化（勿高于室温）；
- 颠倒数次或吹打预混液 3-5 次以混匀；
- 确定反应个数，包括阴性对照管。在反应个数基础上，多配制 1-2 个反应，以避免加样误差、液体挂壁造成的体积损失。

注意：

- 采用 20 μl 反应体系时，各组分的用量如下表所示。当放大或缩小比例时，各组分的用量相应缩小。
- 每一组引物/探针的浓度及用量都应该进行优化，引物的浓度可在 200nM-1μM 范围内优化，探针浓度可在 100nM-300nM 范围内优化

组分	终浓度	体积
GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix (2X)	1X	10μl
Forward primer (20X)	900nM	1μl
Reverse primer (20X)	900nM	1μl
Hydrolysis probe (20X)	250nM	1μl
Template DNA	≤250ng	2–5μl
Nuclease-Free Water		加至总体积 20μl

- 配制反应混合液（不加模板 DNA），轻柔震荡或吹打混匀。
- 将配好的反应混合液分至各反应管。
- 加入 DNA 模板。
- 反应管封口、离心后可上机运行 PCR 程序。在运行 PCR 反应前应注意避光、避免温度升高。

5. 热循环程序

按以下参数运行定量 PCR 程序。必要时可修改参数以获得最佳结果。

标准定量 PCR 程序:

步骤	循环数	温度	时间
GoTaq® 热启动	1	95°C	2 minute
变性	40	95°C	15 seconds
退火/延伸		60°C	1 minute

对于支持快速定量 PCR 程序的仪器, 如 ABI 7500FAST、7900FAST、Roche LightCycler 480 等, 可采用下面的快速 PCR 程序:

步骤	循环数	温度	时间
GoTaq® 热启动	1	95°C	2 minute
变性	40	95°C	3 seconds
退火/延伸		60°C	30 seconds

6. 引用文献

1. Bustin, S.A. et al. (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–22.
2. Dorak, M.T. (2009) Glossary of real-time PCR terms. This can be viewed online at: www.dorak.info/genetics/glosrt.html
3. Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27, 126–39.
4. Lefever, S. et al. (2009) RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, 2065–9.
5. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–8.