

产品简介:

本产品适用于 Probe 探针杂交法进行模板的荧光定量 PCR 检测, RealMasterMix 中提供了一种独特的 Hot-start 酶 (已获得专利), 我们命名为 Hotmaster Taq DNA 聚合酶 (包含在 2.5xrealMasterMix 中), 该酶与一般 Hot-start 酶不同之处在于, 一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性, 而 Hotmaster Taq DNA 聚合酶利用抑制剂通过温度调节方式封闭 Hotmaster Taq DNA 聚合酶的底物结合位点, 温度低于 40°C 时, 形成非活性的酶-抑制剂复合物, 当温度升高至引物特异性的退火温度时, 结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动, 因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生, 大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

反应的 buffer 系统包含 dNTP, 增强剂, 稳定剂等以提高产物特异性和反应灵敏度。RealMasterMix 拥有特殊的 Mg²⁺ 自动调节系统, 在整个反应过程 Mg²⁺ 始终保持最佳浓度, 提高扩增效率。

需自备的试剂:

1. 分子生物学实验级别的水 (无核酸酶)
2. DNA 模板
3. PCR 引物

操作步骤:

Probe 探针杂交法

反应体系

组成成分	50μl 体系	25μl 体系	20μl 体系	终浓度
2.5xrealMasterMix	20μl	10μl	8μl	1x
正向引物	-	-	-	100-900nM
反向引物	-	-	-	100-900nM
探针	-	-	-	50-300nM
20xROX Reference Dye*	-	-	-	-
20xProbe Enhancer solution	2.5μl	1.25μl	1.0μl	1x
DNA 模板	-	-	-	-ng-pg
超纯水	至 50μl	至 25μl	至 20μl	-

* 对于使用 ABI 7500/Stratagene 仪器时, ROX Reference Dye 的终浓度为 0.5x
对于使用 ABI 7300/7700/7900 仪器时, ROX Reference Dye 的终浓度为 1x

PCR 检测:

HotMaster Taq DNA 聚合酶与其他热启动 Taq 酶不同之处是不需要热激活处理, 缩短了整个 PCR 所需时间。对于大多数模板, 起始的解链过程只需 94-95°C 1-2 分钟。如果模板的 GC 含量很高, 则起始解链过程时间需延长至 10-15 分钟, 为得到最佳结果, 对不同的模板可采用梯度 PCR 优化反应条件。

注意: HotMaster Taq DNA 聚合酶的延伸温度范围是 60-70°C, 最佳延伸温度为 68°C。

两步 PCR:

循环	步骤	温度	时间	内容
1x	1	94-95°C	1-2 分钟*	起始模板变性
35-45x	2	94-95°C	10-20 秒	PCR 循环中模板变性
	3	60°C	20-60 秒	退火/延伸

三步 PCR(建议使用):

循环	步骤	温度	时间	内容
1x	1	94-95°C	1-2 分钟*	起始模板变性
35-45x	2	94-95°C	10-20 秒	PCR 循环中模板变性
	3	50-60°C	10-30 秒	退火
	4	68°C	10-60 秒	延伸

* 解链时间的长短与模板的长度和 GC 含量有关

RealMasterMix (Probe)

目录号: FP203—S

试剂盒内容:

试剂盒组成	FP203-01	FP203-02
	50 次×50µl 体系	200 次×50µl 体系
2.5× RealMasterMix	1.0 ml	4×1.0 ml
20×Probe Enhancer Solution	150 µl	600 µl
20× ROX Reference Dye	150 µl	600 µl
说明书	1 份	1 份

储存条件:

该试剂盒在 4°C 可保存 3 个月。若要长时间储存, 请将 RealMasterMix 置于 -20°C。如果 RealMasterMix 解冻后没有使用, 必须彻底混合均匀后才能重新冷冻; 因为在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害。