

版本号: FP121221

## RealMaster Mix (Probe)

目录号: FP203

### 产品内容

产品组成	FP203-01 50 $\mu$ l $\times$ 50 rxn	FP203-02 50 $\mu$ l $\times$ 200 rxn
2.5 $\times$ RealMaster Mix (with ROX)	1 ml	4 $\times$ 1 ml
20 $\times$ Probe Enhancer Solution	150 $\mu$ l	600 $\mu$ l

### 储存条件

该试剂盒在4 $^{\circ}$ C可保存3个月。若要长时间储存, 请将2.5  $\times$  RealMaster Mix置于-20 $^{\circ}$ C。如果RealMaster Mix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。

---

## 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，RealMaster Mix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2.5×realMaster Mix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。RealMaster Mix拥有特殊的Mg<sup>2+</sup>自动调节系统，在整个反应过程Mg<sup>2+</sup>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	50 $\mu$ l 体系	25 $\mu$ l 体系	20 $\mu$ l 体系	终浓度
2.5 $\times$ realMaster Mix	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	8 $\mu$ l	1 $\times$
正向引物	-	-	-	100-900 nM
反向引物	-	-	-	100-900 nM
探针	-	-	-	50-300 nM
20 $\times$ Probe Enhancer solution	2.5 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1 $\times$
DNA模板	-	-	-	-ng-pg
超纯水	至50 $\mu$ l	至25 $\mu$ l	至20 $\mu$ l	-

---

---

## 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 min。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 min，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。

### 反应步骤（建议）

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

\* 解链时间的长短与模板的长度和GC含量有关

---