

M5 GoldStar TaqMan Mixture (UNG+High ROX)使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 GoldStar TaqMan Mixture (UNG+High ROX)	1ml	MF068-01
M5 GoldStar TaqMan Mixture (UNG+High ROX)	5X1ml	MF068-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20℃，有效期 24 个月。经常使用，2-8℃ 保存，尽量避免反复冻融。

【产品简介】

2×GoldStar TaqMan Mixture (UNG) 是专用于探针法 (TaqMan, Molecular Beacon 等) 实时荧光定量 PCR 的预混体系，浓度为 2×，包含 GoldStar Taq DNA polymerase、PCR Buffer、dNTPs (dTTP 全部被 dUTP 所取代)、UNG 酶和 Mg²⁺，操作简单方便。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后的 cDNA 靶序列的检测，如基因表达分析，拷贝数分析，SNP 基因型分析等。本产品中运用了 dUTP-UNG 防污染系统，在 PCR 反应体系配制过程中加入了 dUTP，因此就形成了含有 dU 碱基的扩增产物。而此产物可以在下次进行 PCR 反应前，由 PCR 体系中的 UNG 酶处理消除。这样就有效的去除了 PCR 产物的残留污染，大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。UNG 酶在 PCR 循环中的预变性步骤即可被灭活，因此不会影响新的含 dU 碱基 PCR 产物的形成。本品含有的 GoldStar Taq DNA Polymerase 是一种经化学修饰的、全新高效热启动酶，在常温下没有聚合酶活性，有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增，酶的激活须在 95℃ 下孵育 10 分钟。独特的 PCR 缓冲体系与热启动酶的组合，显著提高了 PCR 的扩增效率，荧光信号更强，灵敏度更高，可以检测单拷贝的模板。使用本产品可以得到更广的线性范围，对目的基因定量更准确。

ROX 染料用于校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差，一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同，因此 ROX 染料的浓度必须与相应的荧光定量 PCR 仪相匹配。不需要 ROX 校正的仪器：Roche LightCycler480, Roche LightCycler96, Bio-radiCycleriQ,iq5,CFX96 等。

需要 High ROX 校正的仪器：ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus 等。

【产品组分】

2×M5 GoldStar TaqMan Mixture (UNG)	5×1ml
50×High ROX	200 μl
ddH ₂ O	5×1ml

【注意事项】

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
- 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20℃，避光。如果在短期内需要频繁使用，可在 2-8℃ 保存。

【使用方法】

以下举例为常规 PCR 反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1.PCR 反应体系:

试剂	50μl 反应体系	浓度
2× M5 GoldStar TaqMan Mixture (UNG)	25μl	1×
Forward Primer, 10μM	1μl	0.2μM
Reverse Primer, 10μM	1μl	0.2μM
Probe, 10μM	1μl	0.2μM
Template DNA	2μl	
50×Low ROX or High ROX (optional)	1μl	1×
ddH ₂ O	up to 50 μl	

- 注意：1) 通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果，可以在 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。
- 2) 使用探针的浓度，与使用的荧光定量 PCR 仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。
- 3) 通常 DNA 模板的量以 10-100 ng 基因组 DNA 或 1-10 ng cDNA 为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。
- 4) 不同仪器的激发光学系统有所不同，根据使用荧光定量的仪器选择加入 50 \times Low ROX or 50 \times High ROX。

2. PCR 反应程序

注意！本产品预变性反应必须在 95°C 10 分钟下完成！

两步法 PCR:

步骤	温度	时间
UNG 酶消化	37°C/50°C	2-10 min.
预变性	95°C	10 min.
变性	95°C	15 sec.
退火/延伸	60°C	1 min. 35-40 个循环

注意：1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95°C，10min 条件下实现酶的活化。

- 2) 建议采用两步法 PCR 反应程序，若因为使用 T_m 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法 PCR 扩增，退火温度请以 56°C-64°C 的范围作为设定参考。

三步法 PCR:

步骤	温度	时间
UNG 酶消化	37°C/50°C	2-10 min.
预变性	95°C	10 min.
变性	95°C	15 sec.
退火	55-65°C	30 sec.
延伸	72°C	30 sec. 35-40 个循环

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。