

TaqMan® Fast Advanced Master Mix 简要操作说明

货号	包装规格	反应次数 (20 µL 体系)	保存条件
4444556	1 × 1 mL	100	第一次使用前保存在 -15~-25 度, 使用后保存在 2-8 度。
4444557	1 × 5 mL	500	
4444963	2 × 5 mL	1000	
4444964	5 × 5 mL	2500	
4444965	10 × 5 mL	5000	
4444558	1 × 50 mL	5000	

本操作说明提供了 TaqMan® Fast Advanced Master Mix 配套 TaqMan® Gene Expression Assays 和 Custom TaqMan® Gene Expression Assays 的简要操作指南。更详细信息, 或与 TaqMan® MicroRNA Assays、TaqMan® Array Micro Fluidic Cards 配套使用, 请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_084554.pdf

一. 配制反应体系

- 充分混匀 TaqMan® Fast Advanced Master Mix。
- 在冰上解冻样品和 TaqMan® assays, 震荡混匀, 离心, 置于冰上待用。
- 根据总的反应数, 参照下表, 在 1.5 mL 离心管中添加如下组分, 配制成混合液。请为各组分预留 10% 的余量, 以免移液损失。

组分	每个反应的体积 (µL)		终浓度
	384 孔板	96 孔板/48 孔板 (快速或者标准)	
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2×)	5.0	10.0	1×
TaqMan® Gene Expression Assay (20×) 或 Custom TaqMan® Gene Expression Assay (20×)	0.5	1.0	1×
无核酶水	3.5	7.0	
总体积	9.0	18.0	—

*如果使用的不是 TaqMan® Assay, 建议使用引物终浓度为 50-900 nM, 探针终浓度为 50-250 nM。

- 涡旋混匀, 短暂离心, 避免产生气泡。
- 参照下表, 将上述配制好的混合液转移到反应板的每个孔中。

反应板类型	反应体系 (µL)
384 孔板	9.0
96 孔板或 48 孔板 (快速或者标准)	18.0

- 将反应板用贴膜覆盖, 短暂离心。避免产生气泡。

7. 移开贴膜，参照以下表格在每个反应孔里加入 DNA 模板或无核酶水。

组分	反应体系 (μL)	
	384 孔板	96 孔板或 48 孔板 (快速或者标准)
DNA 模板 (样品孔) *	1.0	2.0
无核酶水 (NTC, 无模板对照)	1.0	2.0
每个反应总体积	10.0	20.0

*DNA 模板的量为 1 pg - 100 ng

8. 用一张新的光学膜覆盖反应板，上下颠倒混匀反应板 3-5 次，确保孔内的各组分充分混合。

9. 短暂离心，避免产生气泡。

二. 运行 qPCR 反应程序

根据需要选择快速或标准反应模式，并根据仪器型号设置反应参数。

反应模式

Applied Biosystems Real-Time PCR 仪器	模式
7900HT, 7900HT Fast (384 孔板和标准 96 孔板), 7500, 7300	标准模式
ViiA™ 7, StepOne™, StepOnePlus™, 7900HT Fast (Fast 96 孔板), 7500 Fast	快速模式

热循环条件

仪器型号	热循环程序				
	参数	UNG 酶孵育	聚合酶激活 ^[1]	反应程序 (40 个循环)	
		Hold	Hold	变性	退火/延伸
	温度 (°C)	50	95	95	60
7900 HT	时间 (mm:ss)	02:00	02:00	00:01	00:20
7900 HT Fast (fast 96 孔板, 标准 96 孔板或 384 孔板)					
ViiA™ 7					
StepOne/StepOnePlus					
7500 Fast	时间 (mm:ss)	02:00	02:00	00:03	00:30
7500					
7300					

^[1] TaqMan miRNA assays 和 TaqMan fast advanced miRNA assays 的检测，聚合酶激活时间为 20s。

三. 实验数据分析

针对不同的仪器类型，数据分析也略有不同。一般情况下，数据分析主要包括：

1. 观察扩增曲线，根据需要进行设置，比如：
 - a. 设置合适的基线和阈值线
 - b. 将一些典型的异常值从分析中剔除掉
2. 在孔位表或者结果表中，观察复孔之间的 Ct 值是否有差异。
3. 对于绝对定量，观察标准曲线的斜率、扩增效率、 R^2 值、截距、Ct 值和异常值。

MAN0019175 Rev.B

1 Sep 2020



Applied Biosystems

技术支持服务中心

800-820-8982

400-820-8982

Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C