

TaqMan® Gene Expression Assays 简要操作说明 (Rev. A.0)

本操作说明提供了 TaqMan Gene Expression Assays 的简要操作指南。更详细信息，请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书：https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041280.pdf

一. cDNA 模板制备

1. 分离总 RNA

如果检测的目的片段位于一个外显子内，建议在 RNA 提取过程中加入 DNase 处理步骤。

2. 反转录实验

推荐使用 High Capacity RNA to cDNA Kit (PN 4387406) 或者 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (PN 4368813, 4374966)。

同一个实验中用到的所有样本推荐使用同样的反转录步骤。

3. cDNA 可保存在 -15°C 至 -25 °C。

二. 准备 PCR 反应预混液

所有样本使用等量的 cDNA（每 20 µl 反应体系使用 1-100 ng cDNA）

1. 每个样本推荐四次重复，反应体系如下

PCR 组成成分	20µl 体系	
	单孔	4 孔重复 ^[3]
20 X TaqMan Gene Expression Assay	1.0 µl	5.0 µl
2 X TaqMan Gene Expression Master Mix ^[1]	10.0 µl	50.0 µl
cDNA 模板 (1 to 100 ng) ^[2]	4.0 µl	20.0 µl
ddH ₂ O	5.0 µl	25.0 µl

^[1]也可以使用 TaqMan Fast Advanced Master Mix 或 TaqMan Universal Master Mix。如果您使用 UNG 酶，终浓度应为 0.01U/ µl。

^[2]cDNA 使用量不超过 PCR 反应总体积的 20%。

^[3]配制多个反应孔时，请为各组分预留 20%的余量，以免移液损失。

2. 盖上管盖，涡旋混匀，离心。

三. 准备定量 PCR 反应板

1. 在每个反应孔中加入 20 μ l 的反应预混液。
2. 将反应板的膜封好或将八联管的管盖盖好，离心。

四. 运行定量 PCR 反应程序

1. 反应程序：标准模式

仪器	反应板规格	运行模式	反应体积	循环 (40 X)				
				参数	UNG 酶激活 ^[1]	预变性	变性	退火/延伸
				温度 (°C)	50	95	95	60
ViiA 7	384	标准 ^[2]	20 μ l	时间	2 分钟	10 分钟	15 秒	1 分钟
7900HT	96							
	标准							
	384							
StepOne/	48/96							
StepOnePlus	快速							
7500 Fast	96							
	快速							
7300/7500	96							
	标准							

^[1]UNG 酶发挥作用必需的条件。如果反应体系中没有 UNG 酶，可以删除此步骤。

^[2]7300/7500 只有标准运行模式

2. 反应程序：快速模式

仪器	反应板规格	运行模式	反应体积				循环 (40 X)							
				参数	UNG 酶激活 ^[1]	预变性	变性	退火/ 延伸						
				温度 (°C)	50	95	95	60						
ViiA 7	384	快速	20 µl	时间	2 分钟	20 秒	1 秒	20 秒						
7900HT	96													
	快速	标准												
	384													
StepOne/ StepOnePlus	48/96	快速												
	快速													
	96	快速			2 分钟	20 秒	3 秒	30 秒						
7500 fast	快速													

^[1]UNG 酶发挥作用必需的条件。如果反应体系中没有 UNG 酶，可以删除此步骤。



Applied Biosystems
技术支持服务中心
800-820-8982
400-820-8982

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
SCIENTIFIC