

TaqPath™ ProAmp™ Master Mix 简要操作说明

TaqPath™ ProAmp™ Master Mix, with ROX	TaqPath™ ProAmp™ Multiplex Master Mix, with MUSTANG PURPLE™	包装规格	保存条件
A30865	A30868	1 × 1 mL	2-8°C
A30866	A30869	1 × 10 mL	
A30871	A30873	2 × 10 mL	
A30867	A30870	1 × 50 mL	
A30872	A30874	2 × 50 mL	

本操作说明提供了 TaqPath™ ProAmp™ Master Mix 和 TaqPath™ ProAmp™ Multiplex Master Mix 的简要操作指南。其中 TaqPath™ ProAmp™ Master Mix 是以 ROX（吸收光谱 575 nm，发射光谱 602 nm）作为参比荧光，TaqPath™ ProAmp™ Multiplex Master Mix 是以 MUSTANG PURPLE（吸收光谱 647 nm，发射光谱 654 nm）作为参比荧光。

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://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0015758_TaqPathProAmpMMix_UG.pdf

一. 总体实验要求

1. 对于 CNV 实验，每个样本建议进行四次技术重复。
2. 准备反应混合液时，根据实验需求按比例加入除模板外的所有组分。请为各组分预留 10% 的余量，以免移液损失。
3. 对于基因分型实验，NTC（以水代替模板的阴性对照）是基因分型判定所必需的。NTC 也可以被用来鉴定 qPCR 体系是否发生了污染。NTC 理论上不应该发生扩增。

二. DNA 模板量

1. 每个反应孔加入 DNA 模板的总量需要相同；
2. 基因分型实验：每孔模板加入量 1-10 ng DNA，建议终浓度至少 0.2 ng/μL；
3. CNV 实验：每孔模板加入量 10 ng DNA，建议终浓度至少 1 ng/μL。

三. 配制反应体系

1. 按照下表计算每个反应组分所需要的总体积：

基因分型实验体系

组成成分	反应体积		
	5 μ L (384 plate)	10 μ L (fast 96 plate)	25 μ L (standard 96 plate)
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix	2.5 μ L	5.0 μ L	12.5 μ L
TaqMan® SNP Genotyping Assay ^[1] (20 \times working solution ^[2])	0.25 μ L	0.5 μ L	1.25 μ L
Genomic DNA 或者无核酶水 (NTC)	最多 2.25 μ L	最多 4.5 μ L	最多 11.25 μ L
无核酶水	加至总体积 5 μ L	加至总体积 10 μ L	加至总体积 25 μ L
总体积	5 μ L	10 μ L	25 μ L

^[1] 只用于研究，不能用于诊断

^[2] 对于 40 \times 或者 80 \times 包装的 Assay，请使用 1 \times TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 稀释至 20 \times 。

CNV 实验体系

组成成分	反应体积	
	10 μ L (384 plate)	20 μ L (other plate)
TaqPath™ ProAmp™ Master Mix	5.0 μ L	10.0 μ L
TaqMan® Copy Number Assay ^[1] (20 \times ^[2])	0.5 μ L	1.0 μ L
TaqMan® Copy Number Reference Assay ^[1] (20 \times)	0.5 μ L	1.0 μ L
Genomic DNA 或者无核酶水 (NTC)	最多 4 μ L	最多 8 μ L
无核酶水	加至总体积 10 μ L	加至总体积 20 μ L
总体积	10 μ L	20 μ L

^[1] 只用于研究，不能用于诊断

^[2] 对于 60 \times 包装的 Assay，请使用 1 \times TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 稀释至 20 \times 。

2. 用光学贴膜封好反应板，涡旋混匀。

3. 短时离心，避免气泡产生。

注意：配好后的反应板可以在室温放置 72 小时。

三. 设置并运行 qPCR 反应程序

1. 将反应板放在荧光定量 PCR 仪上。

2. 设置合适的反应条件。

基因分型：标准模式（适用于标准 96 孔板）

步骤	温度	时间	循环
预读板	60°C	30 秒	Hold
预变性/DNA 聚合酶激活	95°C	5 分钟	
变性	95°C	15 秒	40
退火/延伸	60°C	60 秒 ^[1]	
终点读板	60°C	30 秒	Hold

^[1] 对于药物代谢酶（DME）assay，将时间设为 90 秒。

基因分型：快速模式（适用于快速 96 孔板或 384 孔板）

步骤	温度	时间	循环
预读板	60°C	30 秒	Hold
预变性/DNA 聚合酶激活	95°C	5 分钟	
变性	95°C	5 秒	40
退火/延伸	60°C	30 秒	
终点读板	60°C	30 秒	Hold

CNV 检测：标准模式

步骤	温度	时间	循环
预变性/DNA 聚合酶激活	95°C	10 分钟	Hold
变性	95°C	15 秒	40
退火/延伸	60°C	60 秒	

3. 开始运行实验。

四. 实验数据分析

对于基因分型实验，可以使用仪器自带的软件进行分析，也可以下载 TaqMan Genotyper™ 软件进行分析：<https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/technical-resources/software-downloads/taqman-genotyper-software.html>。对于 CNV 实验，选择自动基线设置，手动调整阈值线至 0.2（TaqPath™ ProAmp™ Master Mix）或 0.8（TaqPath™ ProAmp™ Multiplex Master Mix），然后使用 CopyCaller™ 软件（下载地址同上）作进一步分析。

出版编号 MAN0019134 修订版 A



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

Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
SCIENTIFIC