

TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix 简要操作说明

货号	试剂名称	包装规格	反应次数 (20 µL 体系)	保存条件
A28521	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX)	0.5 mL	100	-30 度至-10 度
A28522	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX)	5 × 1 mL	1000	
A28523	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX)	10 mL	2000	
A28525	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix	0.5 mL	100	
A28526	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix	5 × 1 mL	1000	
A28527	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix	10 mL	2000	

本操作说明提供了 TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix 和 TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX) 的简要操作指南。其中，TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix 是以 MUSTANG PURPLE (吸收光谱 647nm, 发射光谱 654nm) 作为参比荧光，TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX) 中不含参比荧光。

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/TaqPath_1Step_Multiplex_MasterMix_UG.pdf

一. 总体实验要求

- 在使用本试剂之前，请将其充分混匀。
- 准备反应混合液时，根据要进行的反应数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。
- 对于快速的反应系统，推荐使用 20 µL 的反应体系。
- 对于标准的反应系统，推荐使用 50 µL 的反应体系。

二. 配制反应体系

1. 将所有试剂置于冰上融化。
2. 按照下表，将各个反应组分加入反应板中（配制多个反应孔时，请为各组分预留 10% 的余量，以

免移液损失)

组成成分	快速反应 (20 μ L 体系)	标准反应 (50 μ L 体系)	说明
4 \times TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix	5 μ L	12.5 μ L	—
最多可加 4 个 assay (引物和探针的混合) ^[1]	1 μ L/每个 assay	2.5 μ L/每个 assay	引物终浓度为 150-900 nM; 探针终浓度为 100-250 nM。
RNA 模板	—	—	根据需要可以使用尽可能多的 样品, 只要加入量不超过反应 总体积。
RT-PCR grade water	—	—	加水补足至最终总体积。
总体积	20 μ L	50 μ L	

^[1] 候选 assay 的报告基团可以包括 TaqMan™ Assay Mix FAM™ (20 \times), TaqMan™ Assay Mix VIC™ (20 \times), TaqMan™ Assay Mix ABY™ (20 \times)及 TaqMan™ Assay Mix JUN™ (20 \times)。如果是自行设计合成的引物、探针, 请参考上表中的浓度进行优化。

3. 反应板用光学膜封好, 翻转 3-5 次, 确保孔中的各组分充分混匀, 150 \times g (1000 rpm) 离心 1 分钟, 将混合液离心至管底, 避免产生气泡。注意: TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix 是 4 \times 的预混液, 比其它大多数的预混液都更粘稠。在进行下一步实验之前, 确保每个孔中所有组分都进行了充分混匀。

三. 运行 qPCR 反应程序

1. 将反应板放在荧光定量 PCR 仪上, 根据需要选择快速或标准 PCR 反应程序, 并按照以下表格设置反应参数。

快速反应程序 (反应体系 \leq 30 μ L)

步骤	阶段	循环数	温度	时间
UNG 酶激活	1	1	25°C	2 分钟
反转录 ^[1]	2	1	53°C	10 分钟
聚合酶激活	3	1	95°C	2 分钟
扩增	4	40	95°C	3 秒
			60°C	30 秒

标准反应程序（反应体系>30 μL）

步骤	阶段	循环数	温度	时间
UNG 酶激活	1	1	25°C	2 分钟
反转录 ^[1]	2	1	53°C	10 分钟
聚合酶激活	3	1	95°C	2 分钟
扩增	4	40	95°C	15 秒
			60°C	1 分钟

^[1]反转录在 48°C-55°C 性能最好。

2. 根据所使用的 qPCR 仪器选择合适的反应体系和反应程序。
3. 如果您使用的是 TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix, 那么选择 MUSTANG PURPLE 作为参比荧光; 如果使用的是 TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX), 那么参比荧光一项选择 “None”。
4. 将反应板上机, 开始运行。

四. 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、R² 值、截距、Ct 值和异常值。

出版编号 MAN0019135 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