

## TaqPath™ qPCR Master Mix, CG 简要操作说明

货号 A15297, A16245, A16247, A16248, A15298

本操作说明提供了 TaqPath™ qPCR Master Mix, CG 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://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/TaqPath\\_qPCR\\_MasterMixCG\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/TaqPath_qPCR_MasterMixCG_man.pdf)

货号	包装规格	反应次数 (20 μL 体系)	保存条件
A15297	1 × 5 mL	500	2-8 度
A16245	2 × 5 mL	1000	
A16247	5 × 5 mL	2500	
A16248	10 × 5 mL	5000	
A15298	1 × 50 mL	5000	

### 一. 总体实验要求

- 在使用本试剂之前, 请将其充分涡旋混匀。
- 每个样本推荐进行四次重复
- 建议设置无模板对照 (NTC)。NTC 中包括除模板以外的所有 qPCR 反应成分 (包含 Master Mix, assay, ddH<sub>2</sub>O)。NTC 理论上应该没有扩增。
- 如果要减小反应体系, 请将各组分按比例缩减。不推荐小于 10 μL 的反应体系。

### 二. 配制反应体系

1. 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	反应体积 (μL)			
	384 板	96 孔板 (快速)	96 孔板 (标准)	终浓度
2×TaqPath™ qPCR 预混液	5.0	10.0	25	1×
TaqMan® Gene Expression Assay (20×)	≤3.0	≤8.0	≤20.0	1×*
无核酶水	根据体系调整	根据体系调整	根据体系调整	-
总反应体系	8.0	18.0	45.0	-

\*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。

#### 2. 涡旋混匀

3. 短暂离心，避免产生气泡。
4. 参照下表，将上述配制好的混合液转移到光学反应板的每个孔中。

反应板类型	反应体系 (μL)
384 孔板	8.0
96 孔板 (快速)	18.0
96 孔板 (标准)	45.0

5. 将反应板用贴膜封好，短暂离心。避免产生气泡。
6. 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 (快速)	96 孔 (标准)
DNA 模板 (样品孔) *	2.0	2.0	5.0
无核酶水 (NTC, 无模板对照)	2.0	2.0	5.0
每个反应总体积	10.0	20.0	50.0

\* DNA 模板的量为 1 pg-100 ng

7. 用一张新的光学膜封好反应板，上下颠倒混匀反应板 3-5 次，确保孔内的各组分充分混合。
8. 150 × g 离心一分钟，避免产生气泡。

### 三. 运行反应程序

快速反应模式 (反应体系 ≤ 30 μL)

仪器	参数	UNG 酶孵育	聚合酶激活	PCR (40 个循环)	
				95°C	60°C
QuantStudio™ Dx	温度	50°C	95°C*	95°C	60°C
	时间	02:00	00:20	00:01	00:20
7500 Fast Dx	时间	02:00	00:20	00:03	00:30

\* 激活 DNA 聚合酶。对于难以变性的模板 (如 gDNA)，聚合酶激活的时间在必要时可延长至 10 分钟。

标准反应模式 (反应体系 > 30 μL)

仪器	参数	UNG 酶孵育	酶激活	PCR (40 个循环)	
				95°C	60°C
QuantStudio™ Dx	温度	50°C	95°C*	95°C	60°C
	时间	02:00	00:20	00:15	00:60

\* 激活 DNA 聚合酶。对于难以变性的模板 (如 gDNA)，聚合酶激活的时间在必要时可延长至 10 分钟。

### 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、 $R^2$  值、截距、Ct 值和异常值。

出版编号 MAN0019136 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