

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	2-8 °C
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。

更详细的信息，或与 TaqMan® MicroRNA Assays、TaqMan® Array Micro Fluidic Cards 等配套使用，请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书：https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0025706_TaqManFastAdvMM_UG.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® Assay，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×*
无核酸酶水	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。

5. 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

6. 将反应板用贴膜覆盖，短暂离心。避免产生气泡。

7. 撕掉贴膜，参照以下表格在每个反应孔里加入 DNA 模板或无核酸酶水。

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
无核酸酶水 (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
QuantStudio 系列仪器, 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	
QuantStudio 系列仪器, 7900 HT, 7900 HT Fast (fast 96 孔板, 标准 96 孔板或 384 孔板), ViiA™ 7, StepOne/StepOnePlus	时间 (mm:ss)	02:00	00:20	00:01	00:20
7500 Fast 7500 7300	时间 (mm:ss)	02:00	00:20	00:03	00:30

^[1]酶的激活时间可以延长到 2min 不影响结果。当模板是 cDNA 时, 20s 的激活时间已经足够, 但激活时间延长到 2min 也不影响结果; 当模板是基因组 DNA 时, 较长的酶激活时间有助于双链基因组 DNA 的变性。

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、R² 值、截距、Ct 值和异常值。

MAN 0019175 Rev.C Sep. 2022



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

Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
SCIENTIFIC