

TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG 简要操作说明

货号	包装规格	保存条件
A15299	5 × 1 mL	-15 度~ -25 度 ^[1]
A15300	1 × 10 mL	

^[1] TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix 在-20 度时不会冻结，但可能会呈凝胶状。

本操作说明提供了 TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix 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/MAN0007959_TaqPath_1StepRT_qPCR_MasterMix_CG_UG.pdf

一. 配制反应体系

1. 参照下表配制反应体系。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。
2. 反应体系配好后，用光学贴膜覆盖反应板，充分翻转混匀，离心。

快速反应体系：

组分	反应体积	终浓度
4×TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix	5 µL	1×
TaqMan® Gene Expression Assay	1 µL	如果使用的不是 TaqMan® Gene Expression Assay，建议使用引物终浓度 400-900 nM，探针终浓度 100-250 nM。
样品*	根据需要调整	1 pg 至 100 ng
RT-PCR Grade Water	根据需要调整	—
总体积	20 µL	

标准反应体系：

组分	反应体积	终浓度
4×TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix	12.5 µL	1×
TaqMan® Gene Expression Assay	2.5 µL	如果使用的不是 TaqMan® Gene Expression Assay，建议使用引物终浓度 400-900 nM，探针终浓度 100-250 nM。
样品*	根据需要调整	1 pg 至 100 ng
RT-PCR Grade Water	根据需要调整	—
总体积	50 µL	

*DNA 或 RNA 样本均可，逆转录反应并不会对 DNA 样本造成影响。

二. 运行 RT-qPCR 反应程序

快速反应模式

步骤	阶段	循环数	温度	时间
UNG 酶孵育	1	1	25°C	2 分钟
逆转录*	2	1	50°C*	15 分钟
酶灭活	3	1	95°C	2 分钟
扩增	4	40	95°C	3 秒
			60°C	30 秒

标准反应模式

步骤	阶段	循环数	温度	时间
UNG 酶孵育	1	1	25°C	2 分钟
逆转录*	2	1	50°C*	15 分钟
酶灭活	3	1	95°C	2 分钟
扩增	4	40	95°C	15 秒
			60°C	60 秒

*逆转录反应的温度可以在 48 度至 55 度之间进行调整

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、 R^2 值、截距、Ct 值和异常值。

出版编号 MAN0019133 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