

TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液

用户指南

货号 A54080, A54081, A54082

发布号 MAN0026499

版本 B.0

仅供研究使用。不用于诊断治疗。



中国广州市黄埔区康兆二路77号自编号B3栋1至5层、B4栋1至4层

有关产品标签或产品文件上的符号说明，请查询 [thermofisher.com/symbols-definition](https://www.thermofisher.com/symbols-definition)

本指南中的信息可能随时更改，恕不另行通知。

免责声明：在法律允许的范围内，Thermo Fisher Scientific Inc. 和/或其附属公司不对与本文件有关或由本文件（包括对本文件的使用）引起的特殊、附带、间接、惩罚性、多重或后果性损害负责。

翻译自MAN0025657 Rev. C.0

修订记录：发布号 MAN0026499

版本	日期	说明
B.0	2023年12月11日	更新了生产地址。
A.0	2022年7月7日	TaqMan™乾坤™白金™一步法多重预混液新文件中文版。

重要许可信息：本产品可能涉及一个或多个限用标签许可证。使用本产品即表示接受所有适用的限用标签许可证的条款和条件。商

标：除非另有规定，否则所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。TaqMan 是 Roche Molecular Systems, Inc. 的商标，经同意和许可后使用。

©2022–2023 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。

目录

■ 第 1 章	产品信息.....	5
	产品描述.....	5
	试剂组分和储存条件.....	6
	试剂盒中未包含的其他必需实验材料.....	7
	工作流程.....	8
■ 第 2 章	实验方法.....	9
	一般指南.....	9
	程序指南.....	9
	准备 RT-PCR 反应.....	10
	设置并运行实时 PCR 仪器.....	10
	分析结果.....	11
	分析指南.....	11
	基线和阈值概述.....	11
■ 附录 A	故障排查.....	12
	基因表达检测试剂盒.....	12
■ 附录 B	补充信息.....	22
	TaqMan™ RT-PCR 预混液组分.....	22
	dUTP.....	22
	经优化的缓冲液组分.....	22
	TaqMan™ 酶预混液组分.....	22
	热启动 Taq DNA 聚合酶.....	22
	核糖核酸酶抑制剂.....	22
	热敏尿嘧啶 N-糖基化酶(UNG).....	23
	ROX™ 参比染料.....	23
	化学方法概述.....	24
	关于一步法 RT-PCR.....	24
	5' 核酸酶分析试剂.....	25
■ 附录 C	探针、引物设计指南.....	27
	扩增子位点选择.....	27

	扩增子位点选择的一般性指南.....	27
	如果基因不含内含子.....	27
	探针和引物设计.....	28
	探针设计的一般性指南.....	28
	引物设计的一般性指南.....	28
	寡核苷酸浓度的计算.....	28
	计算寡核苷酸浓度.....	29
	引物浓度计算示例.....	29
	探针浓度计算示例.....	30
	多重法指南.....	30
	靶标丰度.....	30
	引物和探针浓度.....	31
	染料的选择.....	31
	探针的选择.....	32
	验证单重反应.....	32
	验证多重反应.....	34
	评估 PCR 结果.....	35
■	附录 D 实验设计指南.....	36
	用户自行设计定义的检测试剂盒.....	36
	选择实验类型.....	36
	实时 PCR 规范.....	36
	建议的反应类型.....	37
■	附录 E PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范.....	39
	PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范.....	39
	使用 UNG 防止假阳性扩增.....	39
	检测荧光污染物.....	40
■	附录 F 安全.....	41
	化学安全.....	41
	生物危害安全.....	42
■	附录 G 文档和支持.....	43
	相关文档.....	43
	客户和技术支持.....	43
	产品有限保证.....	44



产品信息

■ 产品描述.....	5
■ 试剂组分和储存条件.....	6
■ 试剂盒中未包含的其他必需实验材料.....	7
■ 工作流程.....	8

产品描述

Applied Biosystems™ TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液可与任何 TaqMan™ 引物和探针配合使用进行 RNA 或 DNA 病毒研究。在热循环过程中，逆转录步骤不影响 DNA 靶标的性能。TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液经过优化可用于病原体检测和基因表达分析。

该预混液包括：

- TaqMan™ RT-PCR 预混液 (5X)
 - 含有 dUTP 的 dNTP
 - 经优化的缓冲液组分
- TaqMan™ 酶预混液 (10X)
 - 热启动 Taq DNA 聚合酶
 - 热稳定 MMLV 酶
 - 核糖核酸酶抑制剂
 - UNG
- ROX™ 参比染料 (50X)

有关预混液组分的更详细信息，见附件 B “补充信息”。

TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液可实现对基因存在与否、标准曲线和相对定量实验的一步 RT-PCR 检测。有关实验类型的详情，见第 38 页“建议反应类型”。

试剂组分和储存条件

TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液组分

组分	体积	储存条件 ^[1]
足以进行 200 次 25 μL 反应的试剂（货号 A54080 ）		
TaqMan™ RT-PCR Buffer Mix (5X)	1 mL	-30°C 至 -10°C
TaqMan™ Enzyme Mix (10X)	500 μL	
ROX™ Reference Dye (50X)	100 μL	
足以进行 1,000 次 25 μL 反应的试剂（货号 A54081 ）		
TaqMan™ RT-PCR Buffer Mix (5X)	5 mL	-30°C 至 -10°C
TaqMan™ Enzyme Mix (10X)	2 × 1.25 mL	
ROX™ Reference Dye (50X)	500 μL	
足以进行 5,000 次 25 μL 反应的试剂（货号 A54082 ）		
TaqMan™ RT-PCR Buffer Mix (5X)	25 mL	-30°C 至 -10°C
TaqMan™ Enzyme Mix (10X)	12.5 mL	
ROX™ Reference Dye (50X)	2.5 mL	

^[1]我们不推荐使用无霜冰箱储存此预混液。

注：预混液性能在包装和瓶标上的有效期内有效。



试剂盒中未包含的其他必需实验材料

除非另有说明，否则所有材料均通过 [thermofisher.com](https://www.thermofisher.com) 提供。"MLS" 表示材料通过 [fisherscientific.com](https://www.fisherscientific.com) 或其他实验室用品供应商提供。

货号带有链接，可打开对应产品的网页。

物品	来源
以下 Applied Biosystems™ 仪器之一：	
QuantStudio™ 5 实时 PCR 系统，96 孔，0.2 mL	联系本地销售办事处
7500 实时 PCR 系统	
设备	
离心机，配备用于 PCR 板的适配器	MLS
实验室用混合器（涡旋混合器或同等设备）	MLS
微型离心机	MLS
移液器	MLS
塑料和其他耗材	
反应板和光学贴膜	thermofisher.com/plastics
一次性手套	MLS
带有滤芯的移液器吸头	MLS
聚丙烯试管	MLS
试剂和检测试剂盒	
无核酸酶水（未经 DEPC 处理）	4387936
TE, pH 8.0, 无核糖核酸酶	AM9849
TaqMan™ 基因表达检测试剂盒	thermofisher.com/taqmangeneexpression
定制 TaqMan™ 基因表达检测试剂盒	thermofisher.com/taqmancustomgeneexpression

工作流程

TaqMan™乾坤™白金™一步法多重预混液

准备 RT-PCR 反应（第 10 页）

1. 准备 TaqMan™乾坤™白金™一步法多重预混液和检测试剂盒组分。
2. 涡旋混合试剂组分，然后转移至反应板的相应孔内。
3. 加入样本，将反应板和混合物密封，然后快速离心。

设置并运行实时 PCR 仪器（第 11 页）

1. 选择循环模式（快速或标准）。有关建议，见第 11 页的步骤 1。
2. 设置热循环方案。
3. 将反应板载入仪器，然后启动运行。

分析结果（第 12 页）

1. 根据需要查看并修改扩增图。
2. 查看每个板孔和每个重复组的 C_t 值。
3. 分析标准曲线（针对标准曲线实验）。

2

实验方法

■ 一般指南.....	9
■ 程序指南.....	9
■ 准备 RT-PCR 反应.....	10
■ 设置并运行 PCR 仪器.....	10
■ 分析结果.....	11

一般指南

- 使用 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液的 RT-PCR 可同时检测 DNA 和 RNA。逆转录步骤不会影响 DNA 靶标。
- 将分离的核酸在 -86°C 至 -10°C 下储存。

程序指南

- 检测试剂盒在使用前需按规定避光储存。过度暴露在光下会对检测试剂盒的荧光探针产生不利影响。

注：术语“检测试剂盒”指引物和探针的组合。

- 将检测试剂盒和预混液组分（TaqMan™ RT - PCR 预混液、TaqMan™ 酶预混液、ROX™ 参比染料）（如需要）放在冰上解冻，然后通过颠倒或涡旋充分混匀所有检测试剂盒和预混液组分，但动作要轻。

注：TaqMan™ RT - PCR 预混液和 TaqMan™ 酶预混液具有黏性，所有需要充分混合以及缓慢移液。如果在 TaqMan™ RT - PCR 预混液中观察到沉淀，则继续通过颠倒或涡旋轻轻混合，直到看不到沉淀。

- 首次使用时，可根据实际情况，将检测试剂盒分装，以避免多次冻融。
- 使用 TE 缓冲液或无核酸酶水（未经 DEPC 处理）稀释样本或准备标准品的梯度稀释液。
- TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液可用于多重检测。有关多重反应的设计指南，见《TaqMan™ 多重 PCR 优化用户指南》（发布号 MAN0010189）。
- 对于 TaqMan™ 基因表达检测试剂盒或定制 TaqMan™ 基因表达检测试剂盒以外的检测试剂盒，或使用本方案规定以外的热循环条件时，需要对检测试剂盒进行验证并优化其热循环条件。

准备 RT-PCR 反应

在冰上解冻试剂和核酸样本。将试管颠倒，然后轻轻涡旋混匀，以重悬核酸样本。

- 按照下表准备 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液和引物探针，每种组分的添加量应在下表所列体积的基础上再加 10%，以防移液损失。

组分	每孔的体积 ^[1]
TaqMan™ RT-PCR Buffer Mix (5X)	5 µL
TaqMan™ Enzyme Mix (10X)	2.5 µL
ROX™ Reference Dye (50X) (可选)	0.5 µL
靶标特异性引物和探针 ^[2]	1.25 µL
样本	可变 ^[3]
无核酸酶水（未经 DEPC 处理）	补充至 25 µL
每个反应的总体积	25 µL

^[1] TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液热循环方案建议的反应体积最高为 30 µL。

^[2] 如果没有使用预设计或定制 TaqMan™ 基因表达检测试剂盒（20X），建议您使用终浓度为 400–900 nM 的引物和终浓度为 100–250 nM 的探针。

^[3] 将 1 pg 至 100 ng 的样本核酸加入到反应板孔中。

- 使用光学贴膜将反应板密封，然后将反应板颠倒至少 5 次。确保反应孔中的内容物在贴膜和孔底之间来回移动，以保证充分混合。

注：一次上下翻转算一次颠倒。

- 以 1,400–1,900 × g 的速率将反应板离心 1~2 分钟，收集孔底的内容物。

设置并运行实时 PCR 仪

有关热循环条件设置或反应板运行的详细说明，见相关的仪器指南。

- 选择合适的循环模式。

TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液可与“快速”或“标准”循环模式兼容。

注：对于 QuantStudio™ 5 实时 PCR 系统，96 孔，0.2 mL，建议使用“快速”模式。对于 7500 实时 PCR 系统，使用“标准”模式。

- 设置热循环方案。

热循环方案（反应体积 ≤ 30 µL）

步骤	温度	时间	循环
逆转录 ^[1]	53°C	5 分钟	1
聚合酶激活	95°C	20 秒	1
变性	95°C	3 秒	5 ^[2]
退火/延伸 ^[3]	64°C	27 秒 ^[4]	
变性	95°C	3 秒	35 ^[5]

退火/延伸 ^[3]	60°C	27 秒 ^[4]	
----------------------	------	---------------------	--

- [1] 逆转录酶在 48–55°C 范围内效果最佳。
- [2] 应关闭数据收集功能。
- [3] 确保退火温度与引物设计的熔解温度(T_m)一致。
- [4] 如果使用 7500 实时 PCR 系统，可以根据实际情况，适当延长退火/延伸时间。
- [5] 应打开数据收集功能（默认）。

3. 设置合适的反应体积。
4. 将反应板放置到实时 PCR 仪。
5. 启动运行。

分析结果

由于分析方法因应用而异，所以在用户定义的检测试剂盒中使用 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液的实验产生的数据，本方案提供了一般分析指南。有关数据分析或本方案所述程序的详细信息，见仪器的相应文档。

分析指南

1. 查看扩增图并根据需要修改。
 - 设置基线和阈值。
 - 剔除分析中的异常值。
2. 在板孔表或结果表中，查看每个板孔和每个重复组的 C_t 值。
3. （适用于标准曲线实验）查看标准曲线的相关参数：
 - 斜率
 - 扩增效率
 - R² 值
 - Y-截距
 - C_t 值
 - 异常值

基线和阈值概述

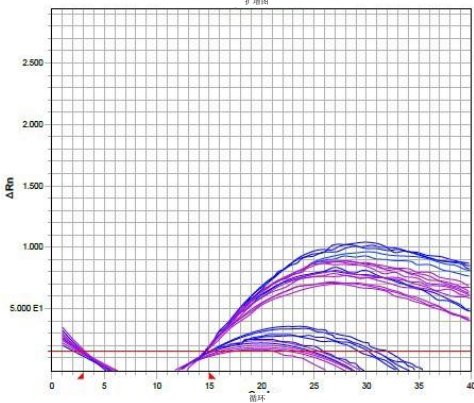
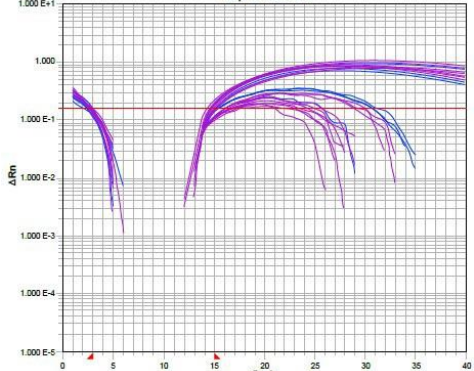
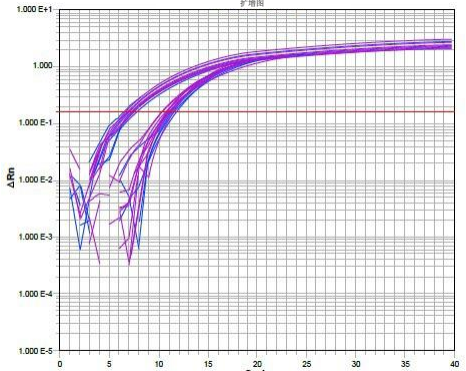
可使用实时 PCR 系统软件自动或手动设置扩增图的基线和阈值。

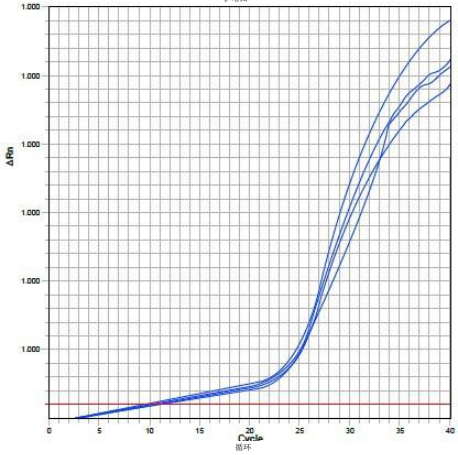
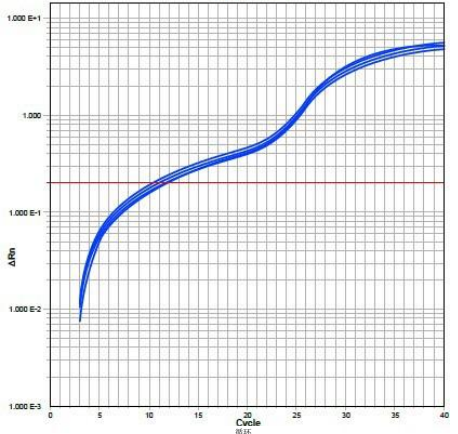
- 基线指荧光信号有轻微变化的初始 PCR 循环阶段。
- 阈值与扩增图的交点决定了实时 PCR 检测试剂盒的 C_t 值。阈值设置在背景信号之上，扩增曲线的指数增长期内。



故障排查

基因表达检测试剂盒

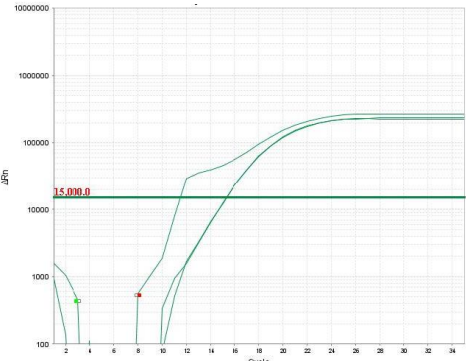
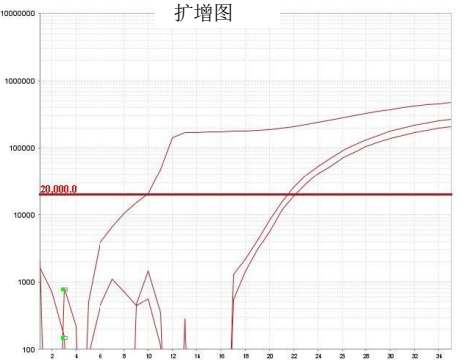
观察结果	可能原因	建议措施
<p>扩增曲线显示异常或低 ΔR_n 值，或二者皆有。</p> <p>详情：线性图：</p>  <p>对数图：</p> 	<p>某些样本的 C_t 值低于基线终止值。</p>	<p>有关基线的设置方法，参见实时 PCR 系统用户指南。</p> <p>从手动基线设置切换至自动基线设置，或将基线终止值前移到较低 C_t，如扩增曲线超过阈值前的 2 个循环。</p> <p>修正的对数图：</p> 
	<p>由于过早检出扩增信号，所以无法设置任何基线。</p>	<p>稀释样本，提高 C_t 值。</p>

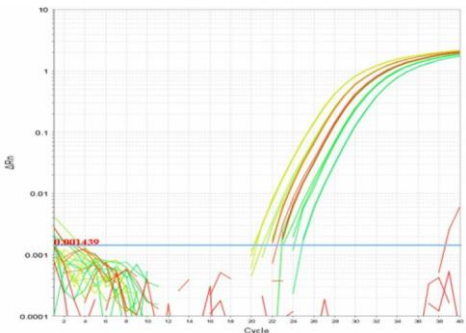
观察结果	可能原因	建议措施
<p>扩增曲线显示基线抬升 详情：线性图：</p>  <p>对数图：</p> 	<p>引物和探针之间存在相互作用。</p>	<p>手动调整阈值。 从相同基因中选择另一个检测试剂盒（如可用）。</p>
<p>多组分图中 ROX™ 染料的信号不平。</p>	<p>纯染料组分光谱错误。 为每个靶标选择了不正确的染料。</p>	<p>重新进行纯染料光谱。 选择正确的染料然后重新进行数据分析。</p>
<p>扩增曲线显示扩增微弱</p>	<p>靶标与检测序列之间序列匹配不当。</p>	<p>执行生物信息学分析。有关更多信息，参见《定制 TaqMan™ 检测试剂盒设计和订购指南》（发布号 4367671）。</p>

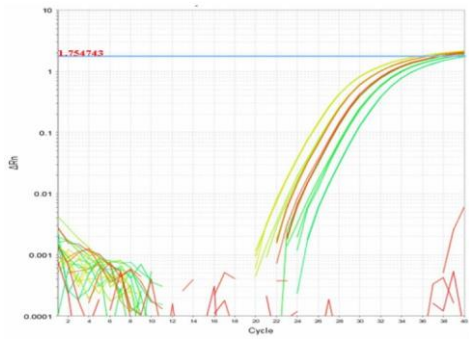
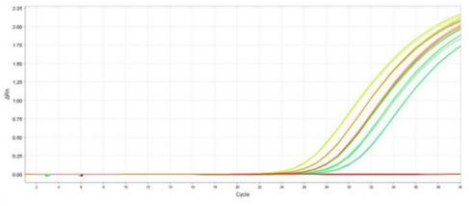
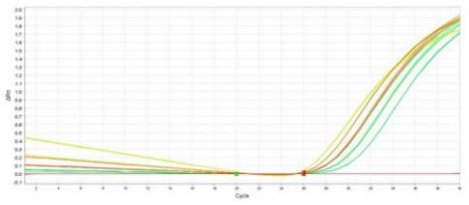


观察结果	可能原因	建议措施
扩增曲线显示扩增微弱 (续)	试剂或探针降解。	检查包装上试剂的有效期。
		遵循正确的处理和储存程序。 避免反复冻融。
	模板降解或被污染。	改善提取方法，提高样本完整性。
		通过琼脂糖凝胶电泳或生物分析仪检查每个模板的准备情况，以确定以下因素： <ul style="list-style-type: none"> • 纯度（应仅形成一种产物） • 降解程度 使用无核糖核酸酶、无菌过滤水。
	反应体系中存在抑制剂。	确认是否存在抑制剂。 <ol style="list-style-type: none"> 1. 对样本进行连续稀释。 2. 使用基因表达检测试剂盒（例如内参）对梯度稀释样本进行检测。如果存在抑制剂，稀释倍数较低的数据点将产生高于预期的 C_t 值，这是因为样本在没有稀释时，抑制剂浓度高，所以产生的抑制作用越强。 3. 使用纯化后的模板重新进行检测。 改善提取方法，提高样本完整性。
RNA 浓度过高或过低。		通过光密度法（OD）确认浓度。
扩增曲线显示样本在所有检测试剂盒或大多数检测试剂盒内无扩增（无 C_t 值）	一个或多个反应组分缺失。	确认是否向反应板中加入模板、检测试剂盒和预混液。
	染料组分选择错误。	检查染料组分和被动参比染料设置，并重新分析数据。
	对引物或探针而言，仪器上的退火温度过高。	确保设置合适的退火和延伸温度。
		确保对仪器进行定期校准和维护。
使用的反应条件不合适。	对 RT-PCR 的优化情况进行故障排查。	

观察结果	可能原因	建议措施	
扩增曲线显示样本在所有检测试剂盒或大多数检测试剂盒内无扩增（无 C_t 值） （续）	模板降解。	确定模板质量。	
		使用新模板重新进行检测。	
		使用无核糖核酸酶的试剂。	
	反应中存在抑制剂。	按照以下步骤确认是否存在抑制剂： 1. 对样本进行连续稀释。 2. 使用基因表达检测试剂盒（例如内参）对梯度稀释样本进行检测。如果存在抑制剂，稀释倍数较低的数据点将产生高于预期的 C_t 值。（这是因为样本在没有稀释时，抑制剂浓度高，所以产生抑制作用越强。 3. 使用纯化后的模板重新进行检测。	
		被动参比染料设置错误（例如，当实际反应不包含 ROX 时，将参比染料设置成了 ROX，反之亦然）。	检查被动参比染料设置是否正确，并重新分析数据。
		图谱的 x 轴和/或 y 轴坐标范围设置不当。	根据实际循环数调整 x 轴坐标范围（例如，如果使用建议的热循环方案，则为 1 - 35，请参见第 11 页步骤 2）。
	根据是否使用被动参比染料，将 y 轴坐标范围更改为与之相适应的值。		
	基线或阈值设置不当。	有关基线和阈值的设置程序，参见实时 PCR 系统用户指南。	
从自动基线设置切换到手动基线设置，或从手动基线设置切换到自动基线设置。			
将阈值降低到合适范围内。			
基因表达检测试剂盒设计或合成失败。	检查是否存在其他转录本或可变剪切体。		

观察结果	可能原因	建议措施
扩增曲线显示样本在所有检测试剂盒或大多数检测试剂盒内无扩增（无 Ct 值） (续)	基因表达检测试剂盒的设计处于基因转录本的可变区域。	确认该检测试剂盒的靶向位置不在 5' 非翻译区 (UTR) 内，因为该区域在转录本之间的差异较大。 如果检测试剂盒的靶向位置处于 5' UTR，则选择处于转录本编码区的其他检测试剂盒。或者选择用于检测其他转录本或可变剪切体的检测试剂盒。
扩增曲线显示，在检测同一靶标的不同样本时，其扩增曲线形状不同。 详情：例如： <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;"> <p>扩增图</p>  </div> <div> <p>扩增图</p>  </div> </div>	基线设置不当。 由于有气泡，导致基线异常	有关基线的设置程序，参见实时 PCR 系统用户指南。 从自动基线切换到手动基线，或从手动基线切换到自动基线。 提高基线范围的起始点或终止点。 使用超过 2,000 × g 的最大加速度对板进行短暂的离心，然后使用最大减速度停止离心以消除气泡。 由于离心机的不同，结果可能会有所不同。
	样本质量差。	进行样本质量检查。 重新提取样本。
	反应板没有混合均匀。	增加颠倒次数，确保在每个颠倒循环内，孔内液体在贴膜和孔底之间来回移动（见第 11 页的步骤 2）。
	由于移液不精确，导致浓度不同。	遵循准确的移液程序进行操作。 降低移液速度。预混液试剂和后续的反应混合物可能较黏。
	试剂或设备被污染。	确保对工作区和设备进行适当清洁。
	扩增曲线显示样本在靶标检测试剂盒中无扩增（无 Ct 值）	一个或多个反应组分缺失。 染料组分选择错误。

观察结果	可能原因	建议措施
<p>扩增曲线显示样本在靶标检测试剂盒中无扩增（无 C_t 值） (续)</p>	<p>检测样本中该基因无表达。</p>	<p>使用以下方法确认样本类型中该基因是否表达：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 重复检测该样本。 • 使用更多样本重新进行检测。 • （仅适用于 <i>TaqMan</i> 基因表达检测试剂盒）使用同一基因中检测不同转录本或一个以上转录本的替代检测试剂盒运行该样本（如可用）。 <p>注：如果该问题无法通过以上建议操作解决，则结论可能是正确的。</p>
	<p>样本中的靶标 RNA 过少。</p>	<p>使用以下方法确认结果：</p> <ul style="list-style-type: none"> • 重新检测该样本。 • 使用更多样本重新进行检测。 <p>注：如果该问题无法通过以上建议操作解决，则结论可能是正确的。</p>
<p>扩增曲线标准差显著高于预期值</p> 	<p>阈值设置在扩增曲线的指数期以下。</p>	<p>将阈线上移到扩增曲线的指数期之内。</p>

观察结果	可能原因	建议措施
扩增曲线标准差显著低于预期值 	阈值设置在扩增曲线的指数期之上。	将阈值线下移到扩增曲线的指数期以内。
扩增曲线在最大基线很远处开始 	基线设置过低。	增加基线终止循环的值。
扩增曲线在最大基线之前开始 	基线设置过高。	减少基线终止循环的值。
减少 ROX™ 染料荧光（被动参比染料）	缓冲液中存在沉淀。	充分混合预混液组分，得到均匀溶液。
	试剂降解。	确保试剂盒和试剂已按照包装上的说明储存。 检查包装上试剂的有效期。
“R _n -vs-循环”图中的 R _n 值极高。	未将 ROX™ 染料（如使用）设置为被动参比染料。	将 ROX™ 染料设置为被动参比染料，然后重新分析数据。
存在较小 ΔR _n	PCR 扩增效率低。	确保试剂的使用浓度正确。

观察结果	可能原因	建议措施
存在较小的 ΔRn (续)	模板数量较低 (靶标拷贝数较低)。	增加模板数量。
无模板对照品 (NTC) 产生 Ct 值 (即扩增曲线超过阈值), 但不是真正的扩增 (即扩增曲线不呈现典型的 S 形)	基线不合适。	从自动基线设置切换到手动基线设置, 或从手动基线设置切换到自动基线设置。
内参 Ct 值变化大或对样本的归一化效果不佳	内参在样本内的表达不一致。	确保内参在样本类型中的表达一致。
	样本浓度不同。	对样本进行定量并实现归一化。
	移液不准确。	检查移液器的校准情况。
		移液至少 5 μL 样本, 准备反应混合物。 降低移液速度。预混液试剂和后续的反应混合物可能较黏。
被动参比染料 (ROX™ 染料) 和报告染料的荧光同时增加 多次重复的标准差较高、数据不一致或 Ct 变化大	反应混合物蒸发。试剂未适当混匀。	检查黏性封板膜的密封是否泄漏。
		增加试剂的混合时长。
		通过重复试验确认混合过程。
	移液不准确。	使用 ROX™ 参比染料归一变化性。
		检查移液器的校准情况。
		移液至少 5 μL 样本, 准备反应混合物。
		降低移液速度。预混液试剂和后续的反应混合物可能较黏。
	阈值设置错误。	使用 ROX™ 参比染料归一变化性。
		参见实时 PCR 系统用户文档。 将阈值设置在背景噪声以上, 扩增曲线重复性最好的位置。

观察结果	可能原因	建议措施
多次重复的标准差较高、数据不一致或 C_t 变化大（续）	靶标浓度低。	使用更多模板重新进行检测。
	存在模板吸附现象（模板吸附在试管上）。	增加载体 RNA，如酵母 tRNA。
C_t 值低于预期。	发生 gDNA 污染。	执行生物信息学分析：设计跨越外显子的检测试剂盒。
		使用脱氧核糖核酸酶处理 RNA 样本，尽量减少 gDNA 的污染。
	cDNA 模板添加过多。	减少 cDNA 模板量。
		测定样本量并实现归一化。
cDNA 模板或扩增子受污染。	遵循既定的 PCR 良好实验室规范进行操作。	
无 RT 对照品中出现扩增。	发生基因组 DNA (gDNA) 污染。	执行生物信息学分析：设计跨越外显子的检测试剂盒。
		改进样本提取方法，消除 gDNA。
		使用脱氧核糖核酸酶处理 RNA 样本，尽量减少 gDNA 的污染。
	cDNA 模板或扩增子受污染。	遵循既定的 PCR 良好实验室规范进行操作。
在 PCR 的早期循环（0 至 5 个循环）过程中， R_n 值发生变化。	荧光未稳定到反应混合物的缓冲液条件。 注：该条件不影响 PCR 过程或最终结果。	重新设置基线范围的下限。
		手动设置基线。
		使用相对阈值算法(C_n)。
阈值上方存在噪声信号。	反应混合物蒸发。	检查黏性封板膜的密封是否泄漏。
	移液不准确导致反应孔空白。	检查移液器的校准情况。
		移液至少 5 μ L 样本。
		降低移液速度。预混液试剂和后续的反应混合物可能较黏。



观察结果	可能原因	建议措施
阈值上方存在噪声信号。 (续)	在设置反应板时， 板孔中分配了样本 或靶标，但实际上 该孔是空白的。	确保反应板文件或实验设置正确。
		去除掉空孔，并重新分析数据。



- TaqMan™ RT-PCR 预混液组分 22
- TaqMan™ 酶预混液组分 22
- ROX™ 参比染料 23
- 化学方法概述 24

TaqMan™ RT-PCR 预混液组分

dUTP

TaqMan™ RT-PCR 预混液含有 dNTP（包括 dUTP），可促进尿嘧啶 N-糖基化酶（UNG）的活性，并保持最佳 PCR 结果。

经优化的缓冲液组分

本预混液的配方中含有经过优化的缓冲液组分，适应单一反应中包含至少三种 RNA 或 DNA 靶序列的多重扩增（例如，使用 FAM™ 染料、VIC™ 染料、ABY™ 染料和 JUN™ 染料）。

TaqMan™ 酶预混液组分

热启动 Taq DNA 聚合酶

Taq DNA 聚合酶的活性被专利的热启动机制所抑制，在反应体系配制过程中抑制非特异性靶标扩增。在 PCR 过程中，聚合酶在 95°C 短暂保温后被重新激活。

核糖核酸酶抑制剂

核糖核酸酶抑制剂是在实验中用于抑制核糖核酸酶活性的酶。

热敏尿嘧啶 N-糖基化酶(UNG)

本预混液含有热敏尿嘧啶 N-糖基化酶 (UNG; 也称为尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG))。UNG 可以减少前一次 PCR 产物所带来的残留污染。

UNG 可降解含 dU 的 PCR 残留产物和错误引发的非特异性 DNA 分子。UNG 通过水解含 dU 的 DNA 位点上的尿嘧啶-糖苷键而作用于单链和双链含 dU 的 DNA。这种酶引起尿嘧啶的释放,并在 DNA 中产生一个碱基敏感的无嘧啶位点。无嘧啶位点阻断了 DNA 聚合酶的复制过程。这种酶在 RNA 或只含有 dT (不包含 dU) 的 DNA 上没有活性。

UNG 酶活性发生在室温下的 PCR 反应设置过程中;在热循环之前不需要进行激活步骤。与标准 UNG 不同,热敏 UNG 在模板变性和聚合酶激活第一个高温步骤的步骤中被完全灭活。

ROX™参比染料

在数据分析时,ROX™参比染料可以将报告染料的信号进行归一化。建议通过归一化操作纠正由于浓度或体积等因素的变化而导致的荧光波动。

化学方法概述

关于一步法 RT-PCR

一步法 RT-PCR 使用经优化的缓冲液组分，可以使 RT 和 PCR 扩增两个阶段不间断发生。

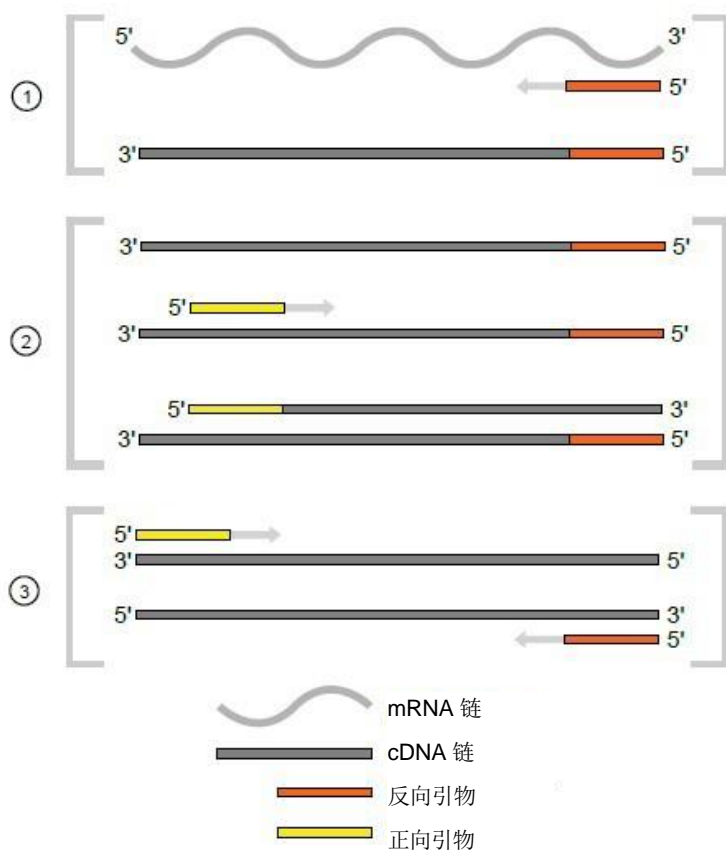


图 1 一步法 RT-PCR

使用 TaqMan 一步法 RT-PCR 试剂盒的反应过程示意图。图中未显示 TaqMan™ 探针的杂交作用。

① RT 步骤

② 第 1 个循环

③ 第 2 个循环

5' 核酸酶分析试剂

5' 核酸酶分析过程（图 2 至图 6）在 PCR 扩增期间发生。该过程在每个循环中都会发生，不影响产物的指数累积。

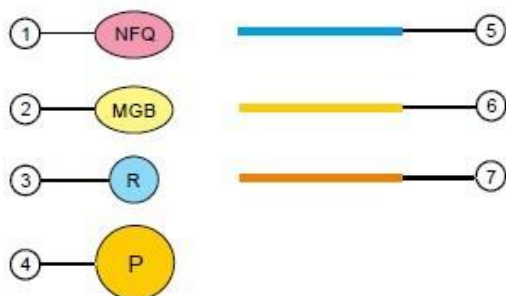


图 2 5' 核酸酶分析过程图的图例

①非荧光淬灭基团

②小沟结合物

③报告基团

④热启动 DNA 聚合酶

⑤TaqMan™ 探针

⑥正向引物

⑦反向引物

在 PCR 过程中，TaqMan™ MGB 探针特异性结合在位于正向和反向引物之间的互补序列上（图 3）。

如果探针完整（图 3 和图 4），则报告基团与淬灭基团主要通过荧光共振能量转移的方式对报告荧光产生抑制（Förster, 1948 年, Lakowicz, 1983 年）。

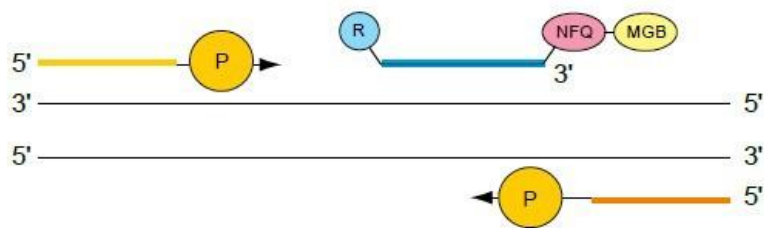


图 3 聚合

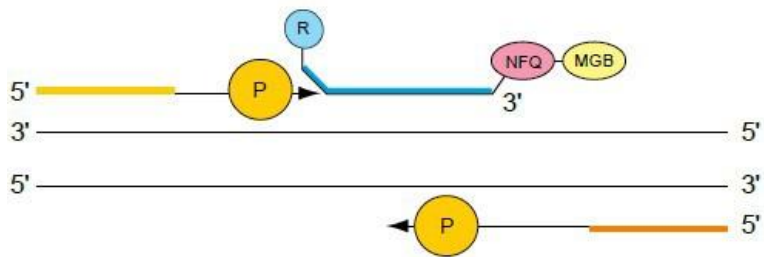


图 4 链置换

DNA 聚合酶仅降解与靶序列结合的探针（图 5）。降解过程将报告基团与淬灭基团分离，这将导致报告基团的荧光增强。仅当靶序列与探针互补并在 PCR 过程中扩增时，荧光信号才会增强。由于存在这些要求，所以此过程通常不会检测到非特异性扩增。

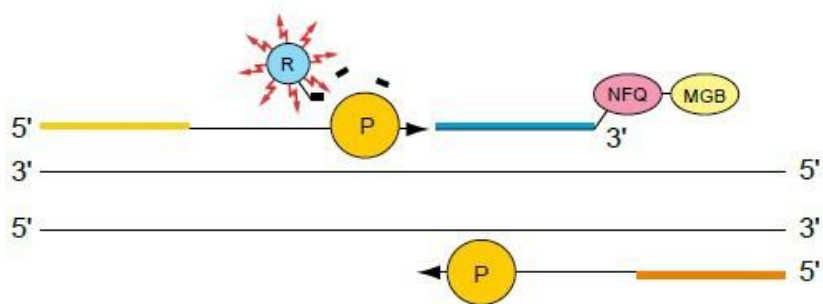


图 5 裂解

聚合反应继续进行，但由于探针的 3' 端已被封闭，所以探针在 PCR 过程中不会发生延伸（图 6）。

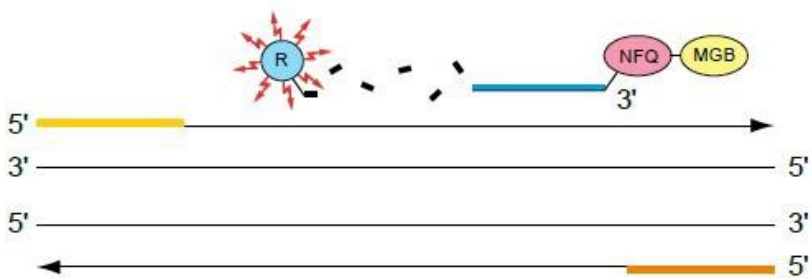


图 6 聚合完成



探针及引物设计指南

■ 扩增子位点选择	27
■ 探针和引物设计	28
■ 寡核苷酸浓度的计算	28
■ 多重法指南	30

本附件为用于定量检测的引物和水解探针提供了一般性设计指南。

扩增子位点选择

扩增子位点选择的一般性指南

使用常用的软件工具进行序列分析和设计，在靶序列中选择一个扩增子位点。选择合适的扩增子位点可确保不会扩增基因组序列、假基因或其他相关基因。

- 对于基因表达检测试剂盒，扩增子应跨越一个或多个内含子，以避免扩增基因组 DNA。
- 扩增子越短，扩增效率越高。通常来讲，50–150 bp 范围内的扩增子更容易获得一致性结果。
- 在检测试剂盒设计中，先设计水解探针，再确定引物对。
- 根据第 29 页“探针和引物设计”中的指南，设计水解探针和引物对。
- 引物对必须特异性地针对靶序列；引物对不能扩增假基因或其他相关基因。
- 对引物对进行检测，选择信噪比最高的引物对（即最早的总 RNA 或 mRNA C_t，不扩增基因组 DNA 或阴性对照）。

如果基因不含内含子

对于基因表达检测试剂盒，如果您正在研究的基因不包含内含子，那么如果没有基因组序列的共同扩增，您将无法确保目标 cDNA 序列的扩增。在这种情况下，您可能需要运行含有灭活逆转录酶的对照反应，以确定 RNA 样本是否含有 DNA。将 TaqMan™ 酶预混液在 95°C 下加热 10 分钟即可灭活逆转录酶。如果无逆转录对照品中出现扩增，则表明 RNA 样本中含有 DNA。如要去除 RNA 样本中的 DNA，使用脱氧核糖核酸酶 I 处理 RNA 样本即可。



探针和引物设计

使用常用的软件工具进行序列分析和设计，先设计探针以检测目标序列的扩增，再设计引物以扩增目标序列。该预混液已针对根据我们的开发指南设计的引物和水解探针进行了优化。浓度为 900 nM 的引物和 250 nM 荧光探针提供了高度可重复和灵敏的测定。

探针设计的一般性指南

- 将 GC 含量保持在 20–80% 的范围内。
- 避免相同核苷酸重复。如果无法完全避免重复，则必须保证连续的 G 碱基小于 4 个。
- 5' 端的碱基不能是 G。
- 选择 C 碱基多于 G 碱基的链。
- 对于单重检测，将 T_m 保持在 68–70°C。

引物设计的一般性指南

- 先设计探针，然后再设计引物。
- 引物序列和探针序列不能有重叠。最佳引物长度为 20 个碱基。
- 将 GC 含量保持在 20–80% 的范围内。
- 避免相同核苷酸重复。如果无法完全避免重复，则必须保证连续的 G 碱基小于 4 个。
- 确保 3' 端的最后 5 个核苷酸包含最多两个 G 和/或 C 碱基。
- 如果无法找到适合的引物序列，则可能需要重新检查靶序列，然后选择另一个扩增子位点或筛选更多的位点。

重要提示！将 T_m 保持在 58–60°C。

寡核苷酸浓度的计算

在收到引物和探针后，使用分光光度法确定检测试剂盒中寡核苷酸的浓度。



计算寡核苷酸浓度

1. 参照下表，根据寡核苷酸序列的碱基组成，计算总的消光系数：

碱基种类及标记的染料	消光系数
A	15,200
C	7,050
G	12,010
T	8,400
FAM™染料	20,958
TAMRA™染料	31,980
TET™染料	16,255
JOE™染料	12,000
VIC™染料	30,100

2. 测量在 TE 缓冲液中稀释（例如，1:100）的寡核苷酸在 260 nm (A_{260})处的吸光度。
3. 使用以下公式计算寡核苷酸的浓度：

$$A_{260} = \frac{\text{总的消光系数} \times \text{比色杯光程} \times \text{浓度}}{\text{稀释比例}}$$

重新排列后计算浓度：

$$\text{浓度(C)} = \frac{\text{稀释比例} \times A_{260}}{\text{总的消光系数} \times \text{比色杯光程}}$$

引物浓度计算示例

如果引物序列为 5'-CGTACTCGTTCGTGCTGC-3'：

- 总的消光系数：

$$= (A \times 1) + (C \times 6) + (G \times 5) + (T \times 6)$$

$$= 167,950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$
- A_{260} 测量示例：
 稀释比例= 1:100
 比色杯光程 = 0.3 cm
 $A_{260} = 0.13$
- 引物浓度：

$$= (100 \times 0.13) \times (167,950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0.3 \text{ cm})$$

$$= 2.58 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$= 258 \mu\text{M}$$



探针浓度计算示例

如果探针序列为 5'-CGTACTCGTTCGTGCTGC-3'，FAM™染料标记在 5'端，而 TAMRA™染料标记在 3'端：

- 总的消光系数：

$$= (A \times 1) + (C \times 6) + (G \times 5) + (T \times 6) + (FAM \times 1) + (TAMRA \times 1)$$

$$= 220,888 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$
- A₂₆₀ 测量示例：
 稀释比例= 1:100
 比色杯光程 = 0.3 cm
 A₂₆₀ = 0.13
- 探针浓度：

$$= (100 \times 0.13) \times (220,888 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0.3 \text{ cm})$$

$$= 1.96 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$= 196 \text{ } \mu\text{M}$$

多重法指南

多重检测可用于定量和定性 PCR 检测。对于相对定量实验，多重检测可用于确定单个样本中不同基因靶标之间的相对表达水平。不同样本之间的归一化通过使用参考基因（通常为丰度较高的管家基因）来实现。对于定性的存在/不存在实验，多重法可用于确定样本中是否存在特定靶标。

根据所选的探针，在一个反应中可检测最多四个靶标。诸多附加因素也会影响多重检测的结果，包括靶标丰度、引物和探针浓度。对于定量和定性两种类型的多重实验，其目标都是尽量减小单重反应和多重反应间 C_t 值的差异。

靶标丰度

在多重检测中，样本中的靶标量（包括内参基因，如使用）可影响 PCR 结果的获取。下表所示为在 PRC 热循环方案中典型的 40 个循环条件下，不同表达水平的靶标所对应的 C_t 值范围。在不同实验系统中，下表中的数值会有不同，用户需要自行确定实际的阈值范围。

靶标表达水平	C _t 范围
高	C _t ≤ 20
中	20 < C _t ≤ 27
低	27 < C _t ≤ 35
无模板对照	C _t > 35



建议使用不同方法抵消多重检测优化过程中的靶标丰度影响。

- 一些丰度高于其他靶标的靶标

当已知一个（或多个）靶标的丰度高于其他靶标时，应限制丰度较高靶标所对应引物的浓度。通常情况下，管家基因/内参基因因为高表达量。使用限制引物浓度的反应条件可防止在丰度较低的靶标开始扩增之前，反应物 dNTP 已被消耗殆尽。

Applied Biosystems™ 限制引物的基因表达检测试剂盒引物终浓度为 150 nM，每个探针的浓度为 250 nM。建议以此为基准开始进行体系优化。

注：除了限制引物浓度外，对于丰度超高的转录本，可能需要调整探针浓度。

- 丰度相似的靶标

如果所有靶标的丰度相似，则无需对任何靶标进行引物限制。但是，我们依然建议进行体系优化，以尽量减小单重和多重反应间的 C_t 差异。建议在开始体系优化时，每条引物的终浓度为 900 nM，探针终浓度为 250 nM。

- 任一靶标均可能具有较高丰度

根据研究的样本，如果任一靶标的丰度均有可能高于其他靶标，则需要对所有靶标进行引物限制。建议针对极端情况（丰度极高/极低）设置反应条件，以此进行体系优化。

引物和探针浓度

三重或四重反应中最重要的第一步是优化每个靶标的引物和探针浓度。

在多重反应中，首先使用标准条件（例如，在最终 PCR 反应中正向引物/反向引物/探针的终浓度分别为 900 nM/900 nM/250 nM），根据反应结果，可能需要对体系做作进一步优化。

如果所需的内参基因靶标可用作引物限制检测试剂盒，则可以利用此现成的试剂盒开始验证双重 PCR 反应体系。但是，如果没有现成的引物限制检测试剂盒，则需要自行降低内参基因的引物浓度。

限制引物浓度的目的是针对丰度较高的靶点，找出能给出最低 C_t 值的引物浓度，而不影响丰度较低的靶标的 C_t 值。限制丰度较高的靶标的引物浓度具有降低 ΔRn 的效果；但是， C_t 应在引物限制的条件下保持不变。为了确定每次检测的最佳引物浓度，应通过减少引物数量的方法检测样本。

染料的选择

通过染料/靶标的合理分配来平衡多重反应中的荧光水平。

- FAM™ 和 ABY™ 染料可用于中低表达量靶标。
- VIC™ 和 JUN™ 染料可用于中高表达量靶标。

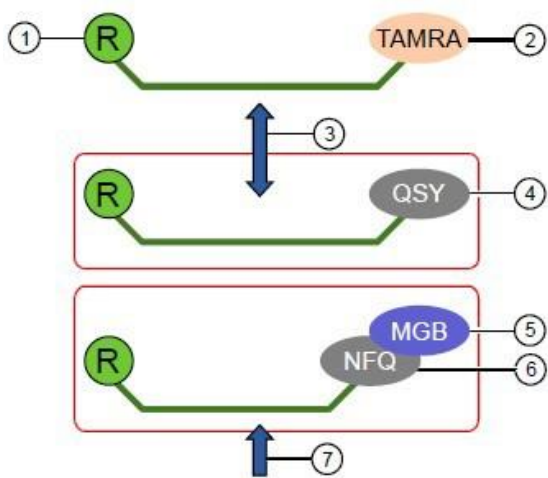
探针的选择

TaqMan™检测试剂盒可使用 QSY™ 探针或 MGB 探针。

使用 QSY™ 探针可在一个反应中检测最多四个靶标（FAM™ 染料、VIC™ 染料、ABY™ 染料和 JUN™ 染料）。

注：使用两个以上 MGB 探针可能会对一些检测试剂盒的性能产生不利影响。

FAM™染料和 VIC™染料可与 MGB/NFQ 或 QSY™淬灭基团配套使用。可通过以下邮箱订购非 MGB 探针的 TaqMan™基因表达检测试剂盒：customorders@lifetech.com



①报告基团

②TAMRA 或 BHQ

③相同的探针序列

④非荧光淬灭基团

⑤Tm 增强子

⑥非荧光淬灭基团

⑦更短的探针序列

验证单重反应

多重反应实验成功的第一步是确保检测试剂盒中的每一个靶标在单重反应中可以正常工作。

1. 根据靶标的表达水平，准备检测混合物。建议浓度如下所示。为获得最佳性能，可能需要进行细微调整。

靶标表达水平	浓度 ^[1]			
	检测混合物（最终）	上游引物	下游引物	探针 1
高	20 X	3 μM	3 μM	5 μM
中	20 X	6 μM	6 μM	5 μM
低	20 X	18 μM	18 μM	5 μM

^[1] 使用 20X 检测混合物，反应中上游引物/下游引物/探针的浓度分别为 150 nM/150 nM/250 nM（高）、300 nM/300 nM/250 nM（中）和 900 nM/900 nM/250 nM（低）。



2. 根据以下表格准备反应混合物。

组分	单重反应 1	单重反应 2	单重反应 3	单重反应 4
TaqMan™ RT-PCR 预混液 (5 X)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
TaqMan™ 酶预混液 (10 X)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
FAM™ 检测混合物 (20 X)	1.25 µL	—	—	—
VIC™ 检测混合物 (20 X)	—	1.25 µL	—	—
ABY™ 检测混合物 (20 X)	—	—	1.25 µL	—
JUN™ 检测混合物 (20 X)	—	—	—	1.25 µL
模板	最多 16.25 µL (1 pg 至 100 ng)			
无核酸酶水 (未经 DEPC 处理)	添加至总体积			
总体积	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

3. 将各组分充分混合，然后快速离心，收集试管底部的内容物，并去除所有气泡。
4. 将每个反应的适当体积转移到光学板的每个板孔中。
5. 使用光学贴膜将反应板密封，然后将反应板颠倒至少五次。确保板孔里的内容物在贴膜和孔底之间来回移动，以保证适当混合。

注：一次上下翻转算一次颠倒。

6. 进行 PCR 反应（见第 11 页的“设置并运行实时 PCR 仪器”）。

7. 分析结果。

验证多重反应（见第 35 页的“验证多重反应”）。



验证多重反应

在单重反应验证完成后，继续评估并优化多重反应。

有关建议浓度，见第 33 页的“验证单重反应”。

1. 在多重反应中混合经验证的单重检测混合物，以确认各组分可在同一体系中使用。

组分	多重（四重）反应
TaqMan™ RT-PCR 预混液 (5 X)	5 µL
TaqMan™ 酶预混液 (10 X)	2.5 µL
FAM™ 检测混合物 (20 X)	1.25 µL
VIC™ 检测混合物 (20 X)	1.25 µL
ABY™ 检测混合物 (20 X)	1.25 µL
JUN™ 检测混合物 (20 X)	1.25 µL
模板	最多 12.5 µL (1 pg 至 100 ng)
无核酸酶水（未经 DEPC 处理）	添加至总体积
总体积	25 µL

2. 将各组分充分混合，然后快速离心，收集试管底部的内容物，并去除所有气泡。
3. 将每个反应的适当体积转移到光学板的每个板孔中。
4. 使用光学贴膜将反应板密封，然后将反应板颠倒至少 5 次。确保板孔中的内容物在贴膜和孔底之间来回移动，以保证适当混合。

注：一次上下翻转算一次颠倒。

5. 以 1,400–1,900 × g 的速率将反应板离心 1~2 分钟，收集孔底的内容物。
6. 进行 PCR 反应（见第 11 页的“设置并运行实时 PCR 仪器”）。



评估 PCR 结果

评估多重实时 PCR 结果，以验证使用选定的多重反应条件时，不会影响反应效率、单重和多重反应间的 ΔC_t 和重复组的标准差。理想情况下，在选定条件下，单重和多重反应的结果间应无任何差异。

- 反应效率

准备样本的梯度稀释液，包含三次重复的七个 10 倍稀释点。使用每个稀释点运行单重检测或多重检测。

建议使用标准曲线法评估（优化）多重检测。针对每个单重和多重检测研究使用的样本和检测试剂盒，运行尽可能多的 10 倍稀释点，每个稀释点三次重复。应运行至少 3 个对数范围，但最多不超过 6 个对数范围。确保标准曲线的动态范围足够宽泛，可包含大多数实验样本，因为所研究靶标的表达水平在不同样本之间可能存在很大差异。

仔细观察标准曲线，确认标准曲线与所有稀释点拟合良好，其相关系数 (R^2) 为 0.98 或以上。如果 R^2 值较低，则表明某些稀释点（通常是最低浓度、最高浓度或二者皆有）不在标准曲线范围内。有关更多信息，请登录：thermofisher.com/qpcrducation

分析结果见对数[模板量] (x 轴) 与 C_t 值 (y 轴) 图。利用标准曲线斜率计算 PCR 效率，公式为：效率 = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$

在单重和多重反应中，靶标在 5 至 6 个对数范围内的扩增效率应为 100% +/- 10%。如果差异显著，则需要重新优化引物和探针浓度。

- 单重和多重反应间的 ΔC_t

使用样本梯度稀释液，计算单重和多重反应中靶标间的 ΔC_t 值。单重和多重反应间的 ΔC_t 值应尽可能相近（如 $\Delta C_t \leq 1$ ）。

单重和多重反应间 C_t 的差异通常可通过调整引物浓度来减少。可以按照下文提供的一般性指南进行调整（见第 33 页的“验证单重反应”）。

- 标准偏差

如果 C_t 标准偏差较高，则表明多重反应中存在竞争或抑制等其他因素，导致重复性欠佳。一般情况下，如果 C_t 的标准差变化小于 3%，则表明重复性良好。

根据单重和多重反应的检测结果，确定样本的标准差。多重反应中 C_t 值的标准差偏高通常可通过调整循环条件尽量降低。如果多重反应中的标准差相对于单重反应有所增加，建议增加退火/延伸时间（增加至 30 ~ 45 秒）。



- 用户自行设计的检测试剂盒 36
- 选择实验类型 36
- 实时 PCR 规范指南 36
- 建议的反应类型 37

用户自行设计的检测试剂盒

有关与预混液配合使用的检测试剂盒的设计，见《TaqMan™ 多重 PCR 优化用户指南》（发布号 MAN0010189）。

注：术语“检测试剂盒”指引物和探针的组合。

选择实验类型

选择以下任一实验类型：

- 存在/不存在
- 相对定量
- 标准曲线

实时 PCR 规范指南

物品	规范
检测试剂盒（引物和探针的组合）	在使用前，将所有检测试剂盒存放在冰箱中，避光保存。 过度暴露在光下可能会影响荧光探针。
	在使用前，可将检测试剂盒放在冰上解冻。
	首次使用时，可对检测试剂盒进行分装，以避免多次冻融。
TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液	在使用前，将 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液组分存放在冰箱中，避光保存。
	在即将使用前，可将 ROX™ 参比染料放在冰上解冻。 注：TaqMan™ RT-PCR 预混液和 TaqMan™ 酶预混液不得冻结，也不需要解冻。

(续)

物品	规范
(用于标准曲线实验) 标准品	标准品是准确分析运行数据的关键。稀释液准备过程中的失误或误差将直接影响结果。在稀释液的测量和混合中，所使用的移液器和吸头的质量以及操作的细心程度将影响准确度。使用 TE 缓冲液或 RT-qPCR 级用水准备标准品梯度稀释液。
无 RT 对照品	如果担心一步法 RT 实时 PCR 检测的是基因组 DNA 而不是特定的 RNA，则可使用预混液运行灭活 RT 对照品实验。 如要运行灭活 RT 对照品实验，需要将 TaqMan™ 酶预混液在 95°C 下加热 10 分钟，然后再将其与检测试剂盒和样本混合。
热循环温度范围	本方案提供了逆转录和退火的最佳温度建议（见第 11 页“设置并运行实时 PCR 仪器”）。 但是在某些情况下，可能还需要更改这一温度。 <ul style="list-style-type: none"> RT 酶在 48–55°C 范围内效果最佳。 退火温度应处于 56–62°C 范围。 注：确保退火温度与引物设计的熔解温度（T _m ）一致。有关引物的设计指南，见第 29 页的“探针和引物设计”。
多重法	TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液设计用于同时运行多个检测试剂盒。 有关多重反应的设计指南，见《TaqMan™ 多重 PCR 优化用户指南》（发布号 MAN0010189）。

建议的反应类型

对于每个实验类型，需要使用以下反应类型。

实验类型	反应类型	说明
存在/不存在	未知样本	含有以下各组分的反应板孔： <ul style="list-style-type: none"> 样本（靶标存在性未知的 DNA 或 RNA） TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液 待检测靶标的检测试剂盒
	外源性内部阳性对照 (IPC)	较短的合成 DNA 模板，可将其添加到反应中，以区分真阴性结果和受 PCR 抑制剂、不正确的检测设置或试剂或仪器故障影响的反应。

(续)

实验室类型	反应类型	说明
存在/不存在	无扩增对照 (NAC)	包含除未知样本和 IPC 外所有反应组分的反应板孔。或者包含 IPC 和 IPC 阻断剂的反应孔板。NAC 反应板孔中不得出现扩增。
	无模板对照 (NTC)	包含除未知样本外所有 PCR 组分的反应板孔。在 NTC 反应板孔中仅应出现 IPC 的扩增。
	复孔	与另一个反应板孔相同的反应板孔。这些反应板孔包含相同的组分。建议对每个反应设置至少三个复孔。
相对定量	未知样本	含有以下各组分的反应板孔： <ul style="list-style-type: none"> • 样本 (靶标数量未知的 DNA 或 RNA) • TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液 • 待检测靶标的检测试剂盒 • 参考基因的检测试剂盒
	无模板对照 (NTC)	包含除未知样本外所有 PCR 组分的反应板孔。在 NTC 反应板孔中仅应出现 IPC 的扩增。
	复孔	与另一个反应板孔相同的反应板孔。这些反应板孔包含相同的组分。建议对每个反应设置至少三个复孔。
标准曲线	未知样本	含有以下各组分的反应板孔： <ul style="list-style-type: none"> • 样本 (靶标数量未知的 DNA 或 RNA) • TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液 • 待检测靶标的检测试剂盒
	标准品	包含已知量 DNA 的反应板孔；在定量实验中用于生成标准曲线。 注：如果只想收集 C _t 值，可在不运行标准品的情况下进行标准曲线实验。
	标准品梯度稀释	一组包含一系列已知量的标准品。标准品梯度稀释通过连续梯度稀释标准品来进行准备。
	无模板对照 (NTC)	包含水或缓冲液而不是样本的阴性对照品反应板孔。在阴性对照反应板孔中不得出现靶标扩增。
	复孔	与另一个反应板孔相同的反应板孔。这些反应板孔包含相同的组分。建议对每个反应设置至少三个复孔。



PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范

PCR 和 RT-PCR 的良好实验室规范

- 穿戴干净手套和实验服。
 - 在处理已扩增的产物或准备样本时，请勿穿戴以前使用过的手套和实验服。
- 如果怀疑手套受到污染，请更换手套。
- 设立独立区域以及专用设备和供应品，以便进行：
 - 样本准备和反应设置。
 - 产物扩增和分析。
- 请勿将已扩增的产物带入反应设置区。
- 小心打开和关闭所有样本试管。避免样本飞溅或喷洒。
- 尽可能盖住反应和组分。
- 使用容积式移液器或带有滤芯的吸头。
- 使用 10% 的漂白剂或 DNA 去污溶液定期清洁实验室工作台和设备。
- 当处理 RNA 样本时，使用核糖核酸酶去污溶液清洁实验室工作台和设备（例如 核糖核酸酶 AWAY™ 表面去污剂（货号 7000TS1）或 RNaseZap™核糖核酸酶去污溶液（货号 AM9780））。

使用 UNG 防止假阳性扩增

残留的 PCR 产物会导致 PCR 过程中出现假阳性扩增。使用含有尿嘧啶 N-糖基化酶（UNG，也称为尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)）的预混液可降解许多具有污染的残留扩增子。

如要确保达到理想的 UNG 活性：

- 按规定使用 PCR 组分和热循环条件。

在含有 UNG 的预混液中混入最佳的 UNG 浓度，以减少交叉污染，同时不会影响实时 PCR 性能。
- 请勿尝试在含有 dU 的 PCR 产物后续扩增过程（如巢式 PCR 方案）中使用含有 UNG 的预混液。UNG 将降解含有 dU 的 PCR 产物，阻碍进一步扩增。

虽然 UNG 处理法可以减少或消除大量的残留 PCR 产物，但还要使用良好的实验室规范来最大限度地减少来自非含 dU PCR 产物或其他样本的交叉污染。



检测荧光污染物

荧光污染物可产生假阳性结果。为了帮助检出这些污染物，建议进行含有样本但不含预混液的无扩增对照反应。

在 PCR 反应后，如果无扩增对照的绝对荧光度大于无模板对照（NTC）的荧光度，则样本或实时 PCR 仪的加热模块中可能存在荧光污染物。



警告！ 一般安全。未按用户文档中规定的方式使用本产品可能会造成人身伤害或仪器或设备损坏。确保使用本品的任何人收到实验室一般安全操作指导和本文件中提供的安全信息。

- 在使用仪器或设备前，请阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中规定的安全信息。
- 在处理化学品前，请阅读并理解所有适用的“化学品安全数据表 (SDS)”并使用适当的个人防护装备（手套、防护服、护目用具等）。见本文件“文档与支持”一节，即可获得 SDS。

化学安全



警告！ 一般化学品处理。为尽量减少危害，确保实验室人员阅读并遵循以下规定的化学品使用、储存和废弃的一般安全指南。有关具体注意事项和说明，请查看相关 SDS：

- 在储存、处理或使用任何化学品或危险物质前，请阅读并理解化学品制造商提供的“化学品安全数据表 (SDS)”。见本文件“文档与支持”一节，即可获得 SDS。
- 尽量减少与化学品的接触。处理化学品时穿戴合适的个人防护装备（如护目镜、手套或防护服）。
- 尽量减少吸入化学品。禁止敞开化学品容器。仅在具备通风装置的条件下使用化学品（例如，通风柜）。
- 定期检查化学品泄漏或溢出情况。如果发生泄漏或溢出，执行 SDS 中建议的制造商清理程序。
- 在通风柜中处理化学品废物。
- 确保使用一次和二次废物容器。（一次废物容器盛装立即处理的废物。二次容器盛装从一次容器中溢出或泄漏的废物。两种容器必须与废弃物物质相容，并符合联邦、州和地方的容器储存要求。）
- 废物容器清空后，使用配套的盖子将其密封。
- 按生成废物的特殊用途、试剂和实验室中使用的基质确定废物的特性（必要时通过分析确定）。
- 确保根据所有地方、州/省和/或国家法规储存、转移、运输和处理废物。
- 重要提示！具有放射性或生物危害的物质可能需要特殊处理，处理限制要求可能适用。

生物危害安全



警告！潜在生物危害。根据仪器上所用的样本，表面可能存在生物危害。当处理生物危害时，采用适当的去污方法。



警告！生物危害。人类和其他动物的组织、体液、传染性病原体 and 血液等生物样本可能传播传染病。使用合适的安全装备（例如物理抑制设备）在装备齐全的设施内进行所有工作。安全装备也可以包括个人防护物品，如手套、外套、长袍、鞋套、靴子、呼吸器、面罩、安全眼镜或护目镜。在处理可能具有生物危害的物质前，应根据适用的法规和公司/机构要求对个人进行培训。遵守所有适用的地方、州/省和/或国家法规。以下参考文件提供了在实验室环境中处理生物样本时的一般指南。

- 美国卫生与公众服务部，《微生物和生物医学实验室的生物安全 (BMBL)》第 6 版，HHS 发布号：(CDC) 300859，修订日期：2020 年 6 月 <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetymicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2020-P.pdf>
- 《实验室生物安全手册》，第四版，日内瓦：世界卫生组织；2020 年（《实验室生物安全手册》，第四版及相关专题论文） www.who.int/publications/i/item/9789240011311



相关文档

文件	发布号
<i>TaqMan</i> [™] 乾坤 [™] 白金 [™] 一步法多重预混液快速参考	MAN0026500
<i>TaqMan</i> [™] 基因表达检测试剂盒快速参考— 96孔标准 (0.2-mL) 反应板	4391139
<i>QuantStudio</i> [™] 3、5 实时 PCR 系统安装、使用和维护指南	MAN0010407
<i>Applied Biosystems</i> [™] 7300/7500/7500 Fast 实时 PCR 安装和维护指南	4347828

客户和技术支持

请访问 thermofisher.com/support thermofisher.com/support，查询最新服务和支持信息。

- 全球联系电话号码
- 产品支持信息
 - 产品 FAQ
 - 软件、补丁和更新
 - 多种应用和仪器培训
- 订购和网络支持
- 产品文档
 - 用户指南、手册和方案
 - 分析证书 (COA)
 - 安全技术说明书 (SDS, 也称为 MSDS)

注：对于来自其他生产商的试剂和化学品的 SDS，请联系该生产商。



产品有限保证

Life Technologies 公司和/或其附属公司根据以下网址中 Life Technologies 的《一般销售条款和条件》对其产品进行保证：www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html。如有任何疑问，请联系 Life Technologies，网址：www.thermofisher.com/support。

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion
thermofisher.com

2023年12月11日

ThermoFisher
SCIENTIFIC