

TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液

货号 A54080、A54081、A54082

文档编号 100110114 发布号 MAN0026500 版本 B.0

注：安全性与生物危险性指南，请查看《TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液用户指南》（刊发号 MAN0026499）中的“安全性”附录。查看《安全数据表》（SDS），并且按照处置说明进行操作。穿戴符合要求的防护目镜、防护服与手套。

产品描述

Applied Biosystems™ TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液可与 TaqMan™ 探针、引物组合一起使用，用于 RNA 或 DNA 病毒研究。在热循环期间，逆转录步骤不会影响 DNA 靶标的性能。TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液经过优化，可用于病原体检测与基因表达分析。

欲了解 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液的更多信息，请查看《TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液用户指南》（刊发号 MAN0026499）。

试剂组分和储存条件

表 1 TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液组分

组分	体积	储存 ⁽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 x 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) 见 100110114 的 SDS 第 6 节。

通用指南

有关产品的其他详细介绍和订购信息，请查看《TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液用户指南》（刊发号 MAN0026499）。

- TaqMan™ 乾坤™ 白金™ 一步法多重预混液适用于 DNA 和 RNA。逆转录步骤不会影响 DNA 靶标性能。
- 将分离后的核酸在 -86°C 至 -10°C 下储存。

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。

1. 按照下表配制反应体系。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系最高为 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，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。

2. 用光学贴膜密封反应板，然后将反应板颠倒至少 5 次。确保反应板孔中的内容物在贴膜与孔底之间来回移动，以保证充分混合。
3. 将反应板以 1,400–1,900 x g 的速度离心 1–2 分钟，收集孔底的内容物。

设置并运行实时 PCR 仪

查看相应的仪器指南，了解热循环条件设置和反应板运行的详细说明。

1. 选择合适的热循环模式。

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：推荐 QuantStudio™ 5 实时 PCR 系统（96 孔，0.2 mL）使用“快速”循环模式，7500 实时 PCR 系统使用“标准”循环模式。

2. 设置热循环方案。

表 2 热循环方案（反应体积 ≤ 30 μL）

步骤	温度	时间	循环次数
逆转录 ^[1]	53°C	5 分钟	1
聚合酶活化	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 的温度范围内性能最佳。

[2] 数据采集应该关闭。

[3] 确保退火温度与引物设计的熔解温度(Tm)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] 数据采集应该开启（默认）。

3. 设置合适的反应体积。

4. 将反应板放置到实时 PCR 仪上。

5. 开始运行。

分析结果

由于分析方法因应用而异，所以针对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

- 查看扩增曲线，并根据需要进行修改。
- 在反应孔表或结果列表表中，查看每个孔、每个重复组的 C_t 值。
- （针对标准曲线实验）查看标准曲线的相关参数：
 - 斜率
 - 扩增效率
 - R² 值
 - Y 轴截距
 - 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。

- 基线是指荧光信号略有变化的 PCR 初始循环。
- 阈值与扩增图的交点定义了实时 PCR 测定中的 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。

分析指南

- 查看扩增曲线，并根据需要进行修改。
- 在反应孔表或结果列表表中，查看每个孔、每个重复组的 C_t 值。
- （针对标准曲线实验）查看标准曲线的相关参数：
 - 斜率
 - 扩增效率
 - R² 值
 - Y 轴截距
 - C_t 值
 - 异常值



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

关于产品标签或产品文件上的符号说明，请访问 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. 和其附属公司不对与本文有关或由本文（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 MAN0023658 Rev. C. 0

修订记录：刊发号 MAN0026500

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™ 一步法多重预混液的新文档中文版。

重要许可信息： 本产品可能包含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。

© 2022–2023 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。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，经许可和授权后使用。