

## 2\***TaqMan Real-Time PCR Master Mix**

**KM403 1ml**

### 试剂组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM403
2* <b>TaqManReal-TimePCR Master Mix</b>	-20°C	1ml
50×ROX Reference Dye	-20°C	40ul
RNase free H <sub>2</sub> O	-20°C	1ml

在-20°C储存 12 个月不影响使用效果, 使用前充分融解混匀, 避免反复冻融。

### 产品介绍:

2\***TaqMan Real-Time PCR Master Mix** 是专用于探针法实时荧光定量 PCR 的两倍浓度的预混合液。产品使用了抗 Taq 抗体的热启动法的 DNA 聚合酶, 与 Real TimePCR 最适的 Buffer 相组合, 可以大大提高 PCR 的扩增效率, 进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。产品单独配置 ROX 染料, 适用于 Applied Biosystems、Bio-Rad、Eppendorf、Roche 等市场主流的荧光定量 PCR 仪使用。本产品适合于快速 Real Time PCR 扩增反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对靶基因进行准确定量、检测, 重复性好, 可信度高。

### 注意事项:

1. 使用 Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Applied Biosystems StepOne™, StepOnePlus™ 等其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪时, 50×ROX Reference Dye 的添加量为 PCR 反应体系的 1/50;
2. Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™等其他需要添加低浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪时, 50 × ROX Reference Dye 的添加量为 PCR 反应体系的 1/250;

3. 下列是不需要添加 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪: Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™ 5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, Cepheid SmartCycler®, Eppendorf Mastercycler®ep realplex, realplex 2, Illumina Eco qPCR, Qiagen/Corbett Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000, Roche Applied Science LightCycler™ 480, Thermo Scientific PikoReal Cyclers 等。

### 操作步骤:

1. 在 -20°C 存放的 2\* TaqMan Real-Time PCR Master Mix 使用前可用手握缓慢溶解, 轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。配制 PCR 反应液时, 试剂请于冰上放置并应避免强光照射。避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
2. 按照下列组分配置 PCR 溶液

Components	Volume	Final Concentration
2* TaqMan Real-Time PCR Master Mix	10 µl	1 ×
PCR Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
探针 (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
50× ROX Reference Dye	0.4 µl	1 ×
DNA模板	2.0 µl	
ddH <sub>2</sub> O	To 20µl	
total	20µl	

请按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

### 注意:

1. 通常引物和探针的终浓度为0.2µM可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在0.1~1.0 µM范围内调整引物和探针的浓度。

2. 在20 $\mu$ l反应体系中, DNA模板的添加量通常在100ng以下。因不同种类的DNA模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的DNA模板添加量。如果欲使用本产品进行两步法RT-PCR反应的第二步PCR扩增反应, 第一步的RT反应液作为DNA模板时的添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。

### 3. 进行Real Time PCR反应

建议采用下列的两步法PCR反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行PCR条件的优化。由于使用Tm值较低的引物等原因, 两步法PCR反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法PCR扩增反应。

#### 2. PCR 反应扩增程序

扩增程序二步法				扩增程序三步法			
循环步骤	温度	时间	循环数	循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30sec	1	预变性	95°C	30sec	1
变性	95°C	5sec	40	变性	95°C	5sec	40
退火/延伸	60°C	30-34sec		退火	60°C	15-20sec	
				延伸	72°C	20-30sec	
溶解曲线阶段	仪器默认设置	1		溶解曲线阶段	仪器默认设置	1	

**结果分析:** 定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及溶解曲线。

1. 扩增曲线: 标准扩增曲线为S型。Ct值落在20-30之间时, 定量分析最准确; Ct值小于10, 需要将稀释模板后, 重新进行实验; Ct值介于30-35之间时, 需要提高模板浓度, 或者增大反应体系的体积, 以提高扩增效率, 保证结果分析的准确性; Ct值大于35时, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。

2. 溶解曲线: 溶解曲线单峰, 表明反应特异性好可以进行定量结果分析; 若溶解曲线出现双峰或者多峰, 则不能进行定量分析。溶解曲线出现双峰, 需要通过DNA琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。如果是引物二聚体, 建议降低引物浓度, 或者重新设计扩增效率高的引物。如果是非特异性扩增, 请提高退火温度, 或者重新设计更高特异性的引物。