



TaqMan Master Mix 说明书

货号：NH9212

规格：2X

适用仪器

TaqMan Master Mix 中含有特殊的 ROX 参比染料，适用于所有类型的荧光定量 PCR 仪。

储存条件：

-20℃ 储存。使用时推荐小量分装，避免反复冻融。由于含有 ROX 染料，需避光保存。

产品简介

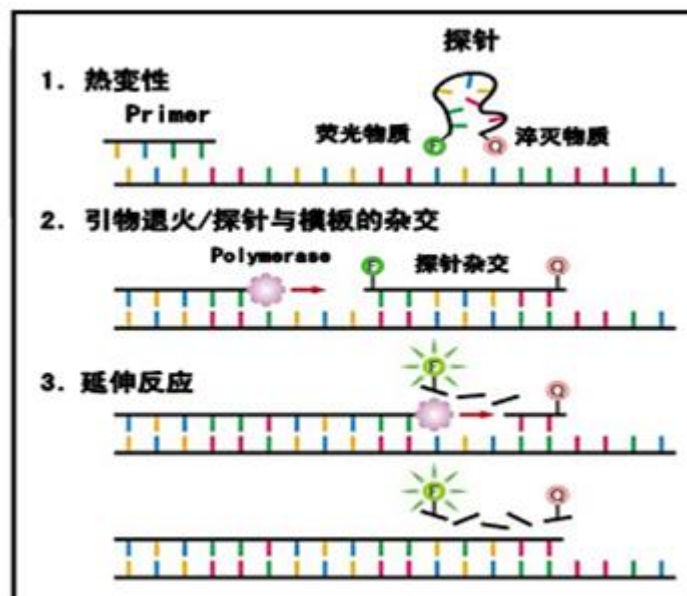
TaqMan Master Mix 是采用探针法（TaqMan, Molecular Beacon 等）进行 Real Time PCR 的专用试剂。

本制品包含经化学修饰的 Hot Start Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、经优化后的缓冲液等扩增必需组分(模板、探针与引物除外)，可以有效抑制体系中非特异性 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率，进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。

本制品具有广泛的可适用性。对 80-150bp 的常规 DNA 片段具有良好的扩增效果，可达到较高的扩增效率，对长度达 300bp 的片段仍表现出较强的扩增优势。本制品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。

原理

TaqMan 探针法是使用 5'端带有荧光物质（如 FAM 等），3'端带有淬灭物质（如：TAMRA 等）的 TaqMan 探针进行荧光定量的检测方法。当探针完整时，5'端的荧光物质受到 3'端淬灭物质的制约，不能发出荧光。而当 TaqMan 探针被分解后，5'端的荧光物质便会游离出来，发出荧光，通过荧光定量 PCR 仪检测荧光信号以达到定量、检测的目的。





特点与优势

快速：广泛适用于 Real Time PCR 反应，使用两步法可快速、准确地对目的基因进行检测或定量。

灵敏：能有效检测低拷贝数模板量，在同等模板量的前提下，本产品经 40 循环扩增后具有更低的 Ct 值及更高的信号值。

广泛适用：在极大模板用量范围内，不仅对常规长度 80-150bp 的 DNA 片段具高效的扩增效率，对长度达 300bp 的片段仍表现出较强的扩增优势。

高重复性：优化的反应体系，保证实验间的高度重复性与可现性。

注意事项

以下为使用本产品时的注意事项，请务必在使用前认真阅读。

1、使用时请上下颠倒混合均匀，并经轻微离心后使用。请不要使用振荡器混匀，避免起泡。若试剂未混匀，其反应性能会有所下降。。

2、TaqMan Master Mix 中含有 ROX，储存制品或配制 PCR 反应液时，应避免强光照射。

3、在配制、分装反应液时请一定使用新的（无污染的）枪头、离心管等。

4、在配制 PCR 反应液时不建议每管单独配制。若需同时进行多个反应，推荐预先配制 N+1 或 N+2 次 PCR 反应所需各种成分的预混液，同时推荐使用可进行连续滴定的电子移液枪将上述 PCR 混合液分加于每个 PCR 反应管中，以保证较高的实验重复性及可信度。

5、在 PCR 反应时建议每个反应设置至少三管重复，同时在每次反应时均设置 NTC（No template control）组，即阴性对照组，用于检测体系是否污染。

6、为获得良好实验结果，保证较好的实验重复性，推荐使用紫外分光光度计对引物的实际浓度进行测定(测定方法见引物浓度测定)。

7、请严格按照本说明书中“引物及探针设计说明”，进行引物及探针的设计。

使用方法

以 Roche LightCycler® 480 为例，介绍本产品的使用方法。在使用 LC480 时，请按照仪器使用说明书进行实验操作。

1、按照下表配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	试剂终浓度
Taqman Master Mix (2×)	12.5μl	1×
PCR Forward Primer (10μM) * ¹	0.5-1μl	200-400nM
PCR Reverse Primer (10μM) * ¹	0.5-1μl	200-400nM
探针 * ²	0.5-1μl	200-400nM
DNA 模板 * ³	1μl	1-100ng
灭菌水	Up to 25μl	/



*1 通常引物、探针浓度为 0.2uM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0uM 范围内调整浓度。

*2 探针浓度，与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 在 25ul 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。如果欲使用本制品进行 2 Step RT-qPCR 反应的第二步 qPCR 扩增反应时，以第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板的添加量不要超过反应总体积的 10%。

2、PCR 反应液配制完成后，上下颠倒混匀并离心，将反应液分装，加入 96 孔 PCR 反应板中，约 2000g/min 转速下离心 1-2min，封口膜封口，置于仪器中进行 PCR 反应。

3、Real Time PCR 反应

推荐使用两步 PCR 反应法进行 Real Time PCR 反应。当采用两步法无较理想扩增效果时可适当调整，采用三步法进行 PCR，使用三步法时退火温度依据设计引物确定，延伸温度推荐使用 68℃。

两步法反应程序为：

反应		温度	时间	循环数
荧光定量 PCR	预变性	95℃	10min	1
	变性	95℃	5S ^{*1}	40-50
	退火	55-65℃ ^{*3}	40S ^{*2}	
	延伸			

三步法反应程序为：

反应		温度	时间	循环数
荧光定量 PCR	预变性	95℃	10min	1
	变性	95℃	5S ^{*1}	40-50
	退火	50-55℃ ^{*4}	5S	
	延伸	68℃	40S ^{*2}	

*1 在扩增高 GC 含量片段时，可适当增加变性时间至 15-30 秒。

*2 退火延伸时间，可根据所扩增片段长度及荧光定量 PCR 仪器做调整。

*3 请先使用 60℃ 进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在 55-68℃ 范围内进行。

*4 通常引物退火温度比引物的解链温度(Tm)低 5℃。如果需要进一步优化，可以尝试在 50-55℃ 范围内进行。



4、实验结果分析

反应结束后，确认 Real Time PCR 的扩增曲线，进行 PCR 定量并制作标准曲线等，此时需确认 NTC 组不存在扩增。

引物及探针设计说明

进行 Real Time PCR 时，设计反应性能良好的 PCR 引物至关重要。我们推荐按照如下原则设计 PCR 引物，从而能够提高 PCR 扩增效率，提高 PCR 反应特异性。

PCR 扩增产物长度：80-200bp 为最佳(可延长至 300bp)，GC 含量最高可达到 70%。

引物设计原则如下：

长度	引物建议设计 17~25 bp
GC 含量	40~60% (45~55%最佳)
Tm 值	尽量保证 Forward Primer 和 Reverse Primer 两引物 Tm 值一致。 引物 Tm 值计算软件： Oligo: 63~65℃ Primer Premier 5: 60~62℃ Primer Express: 58~60℃ (强烈推荐)
序列	A、G、C、T 整体分布尽量均匀，避免 GC rich 或 AT rich (特别是 3' 端)，避免连续碱基，尤其是 G。 引物 3'端碱基最好为 G 或 C，避免 A 或 T。
二级结构	引物内部避免形成发夹结构及二聚体，两引物间避免有互补序列，两条引物间 3'末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST 检索确认引物的特异性。

TaqMan 探针设计原则如下：

长度	探针长度应在 15-45bp (最好是 20-30bp)，以保证结合特异性
GC 含量	40~70% (45~55%最佳)
Tm 值	尽量保证 Forward Primer 和 Reverse Primer 两引物 Tm 值一致。 探针 Tm 值计算软件： Primer Express: 68-70℃
序列	探针 5'末端避开碱基 G。 A、G、C、T 整体分布尽量均匀，避免 GC rich 或 AT rich (特别是 3' 端)，避免连续碱基，尤其是 G。 整条探针中，碱基 C 的含量要明显高于 G 的含量



二级结构	内部避免形成发夹结构及二聚体。
特异性	使用 BLAST 检索确认探针的特异性。

引物及探针浓度测定

部分引物合成厂家提供的引物量与实际量偏差较大。对于普通 PCR，此种偏差对实验不会造成很大差异，但在进行 Real Time PCR 时，此种浓度偏差将给实验带来很大的差异。为此，强烈推荐在进行 Real Time PCR 前，对所用引物的实际浓度进行测定。

具体测定及计算方法为：

1	将引物溶于 TE 缓冲液中稀释 100 倍，紫外分光光度计测定 260nm 吸光值 OD ₂₆₀ 。
2	计算每条引物的总吸光系数。 总吸光系数=Σ（单碱基吸光系数×引物碱基数目）。
3	按照如下公式计算引物浓度(μM) 由 OD ₂₆₀ =总吸光系数×光程×浓度 C/100 得到：浓度 C=100×[OD ₂₆₀ /(总吸光系数×光程)]

如下为引物浓度计算实例：

在该例中引物序列为 CGTACTCGTTCGTGCTGC，引物浓度是如此测定并计算的。
将引物溶解于 TE 缓冲液中并稀释 100 倍。

碱基类型	吸光系数	碱基数目	总吸光系数
A	15200	1	15200
C	7050	6	42300
G	12010	5	60050
T	8400	6	50400
总计	——	——	167950

紫外分光光度计测定 OD₂₆₀=0.13

总吸光系数=167950 M⁻¹cm⁻¹

比色皿光程=0.3cm

将上述数值带入公式 OD₂₆₀=总吸光系数×光程×浓度/100 中为：

0.13=167950 M⁻¹cm⁻¹×0.3cm×C/100

则 C=258μM。



常见问题及处理

1. 扩增曲线形状异常

a).扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生，提高模板浓度重复试验。

b).扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 Ct 值。减小基线终点(Ct 值-4) ，重新分析数据。

c).个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。处理样本时要注意离心、进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

2. 反应结束无扩增曲线出现

a).反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。

b).确认程序中是否设置了信号采集步骤：两部法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72℃延伸阶段。

c).确认探针/引物是否降解：长时间未用的探针/引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能性。

d).模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

e).模板降解：重新制备模板，重复试验。

3. Ct 值出现太晚

a).扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物

b).模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

c).模板降解：重新制备模板，重复试验。

d).PCR 产物太长：一般将 PCR 产物长度设计为 80 bp-150 bp 之内。

e).反应体系中存在 PCR 反应抑制剂：一般为加入模板时带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

4. 阴性对照也出现明显扩增

a).反应体系或者水被污染：更换新的 Mix 或者水重复试验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。

b).引物二聚体的出现：一般在 35 循环以后阴性对照出现扩增属正常情况。

5. 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

a).加样误差：加大模板稀释倍数，提高加样体积。

b).标准品降解：重新制备标准品，重复试验。

c).模板浓度太高：增加模板稀释倍数。

6. 实验重复性差

a).加样体积失准：使用性能较好的移液枪，扩大反应体积，将模板做高倍稀释，以大体积



加入反应体系中。

b).定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。

c).模板浓度太低：模板浓度越稀，重复性越差，减少模板稀释度活提高加样体积

7. 预变性时间

本产品使用的酶是化学修饰的热启动 Taq 酶，需要设置预变性温度为 95℃，时间为至少 10 分钟，以充分释放酶活。

联系方式

苏州新海生物科技股份有限公司 NuHigh Biotechnologies Co., Ltd

地址：苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米科技园 C8 楼 301 单元

邮编：215123

电话：0512-69561912

传真：0512-69561913

网址：www.nuhighbio.com